

KLONIERUNG GENOMISCHER cDNA
DES PARAMYXOVIRUS 6/94 ZUM
NACHWEIS DER LEBENSLANGEN
PERSISTENZ LATENTER 6/94 RNA
IN C129 MÄUSEN

Edith Koch

*Diss
München
1995*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0037

**KLONIERUNG GENOMISCHER cDNA DES PARAMYXOVIRUS 6/94 ZUM
NACHWEIS DER LEBENSLANGEN PERSISTENZ LATENTER 6/94 RNA
IN C129 MÄUSEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Edith Koch
aus Schwabach

München, 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 7.Mai 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	4
1.1. Virusinfektionen allgemein	4
1.1.1. Akute Virusinfektionen	4
1.1.2. Produktive, persistierende Virusinfektionen	5
1.1.3. Latente Virusinfektionen	7
1.2. Paramyxoviren	8
1.2.1. Morphologie und Replikation von Paramyxoviren	8
1.2.2. Paramyxovirus-Infektionen von Zellkulturen und Versuchstieren	10
1.2.2.1. Virale Mechanismen der Persistenz	10
1.2.2.2. Zelluläre Mechanismen der Persistenz	13
1.2.3. Human-Medizinische Bedeutung persistierender Infektionen mit Paramyxoviren	15
1.3. Das Sendaivirus 6/94	17
1.3.1. Isolierung des 6/94-Virus aus Gehirnzellen von Multiple-Sklerose-Patienten	17
1.3.2. Klassifizierung des 6/94-Virus	19
1.3.2.1. Eigenschaften und Struktur des 6/94-Virus	19
1.3.3. Infektionsverhalten des 6/94-Virus in Zellkulturen	21
1.3.4. 6/94-Virusvarianten	23
1.3.4.1. Molekulare Unterschiede der 6/94-Virusvarianten	26
1.3.5. 6/94-Virusinfektionen von Versuchstieren	27
1.3.6. Nachweis latenter 6/94-Virusinfektionen	28
PROBLEMSTELLUNG	32
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1. Material	33
2.2. Puffer und Lösungen	39
2.3. Methoden	49
2.3.1. Virusvermehrung im bebrüteten Hühnerei	49
2.3.2. Virologische Tests	49
2.3.2.1. Hämagglutinationstest	49

2.3.2.2. Kulturinfektionsdosistest	50
2.3.2.3. HämadSORbTionstest	50
2.3.2.3.1. Direkter HämadSORbTionstest	50
2.3.2.3.2. Indirekter HämadSORbTionstest	51
2.3.2.4. Virusspezifische Immunfluoreszenz	51
2.3.2.5. Hämagglutinations-Hemmungstest	51
2.3.2.6. ELISA	52
2.3.3. Reinigung von 6/94-Viren aus Allantoisflüssigkeit	53
2.3.4. RNA-Extraktion aus gereinigten Viruspartikeln	54
2.3.5. Isolierung genomischer RNA des 6/94-Virus	54
2.3.6. Zellkultivierung	55
2.3.6.1. Anlegen von Primärkulturen	55
2.3.6.2. Infektion von Zellkulturen mit 6/94-Viren	56
2.3.7. Versuchstiere	56
2.3.7.1. Infektion von Versuchstieren mit 6/94-Viren	56
2.3.8. Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellkulturen und Geweben	57
2.3.8.1. Extraktion von Gesamt-RNA	57
2.3.8.2. Extraktion von cytoplasmatischer RNA	58
2.3.8.3. Extraktion von chromosomaler DNA	58
2.3.8.4. Extraktion von viraler mRNA aus 6/94-infizierten Zellkulturen	58
2.3.9. Extraktion von Proteinen aus Viren, Zellkulturen und Geweben	59
2.3.10. Gelelektrophoresen zur Auftrennung von Nukleinsäuren	60
2.3.10.1. Nicht-denaturierende Agarosegele	60
2.3.10.2. Denaturierende Agarosegele	61
2.3.10.2.1. Glyoxalgele	61
2.3.10.2.2. Harnstoffgele	61
2.3.11. Synthese doppelsträngiger viraler cDNA	62
2.3.11.1. Polyadenylieren	62
2.3.11.2. Messung der säurefällbaren Radioaktivität in Nukleinsäuren	63
2.3.11.3. Syntheseberechnungen	64
2.3.11.4. Synthese einzelsträngiger cDNA	65
2.3.11.5. C-Tailing der ss cDNA	66

2.3.11.6.	Synthese des zweiten cDNA-Stranges	66
2.3.11.7.	Abbau einzelsträngiger Enden mit S1-Nuklease	67
2.3.12.	Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen	67
2.3.13.	DNA-Isolierung aus Phagen	68
2.3.14.	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	69
2.3.15.	Präparation von Plasmid-DNA	69
2.3.15.1.	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	70
2.3.16.	Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	71
2.3.17.	Ligieren von DNA-Fragmenten	71
2.3.18.	Das lambda-Klonierungssystem	72
2.3.18.1.	Vorbereiten der Klonierungsvektoren	72
2.3.18.2.	Präparation von Verpackungsextrakten	72
2.3.18.3.	In vitro Verpackung von DNA	73
2.3.18.4.	Plaque-Screening	74
2.3.19.	Reklonieren von DNA in Plasmide	74
2.3.20.	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	75
2.3.20.1.	Endmarkierung von RNA	75
2.3.20.2.	Nick-Translation von DNA	76
2.3.21.	Blotten von Nukleinsäuren auf Filtermembranen	78
2.3.21.1.	Dot Blot	78
2.3.21.2.	Southern Blot	78
2.3.21.3.	Northern Blot	79
2.3.22.	Hybridisierungen	79
2.3.22.1.	DNA-DNA-Bindungen	80
2.3.22.2.	RNA-DNA-Bindungen	80
2.3.23.	Sicherheitsmaßnahmen	81
3.	ERGEBNISSE	82
3.1.	Vorüberlegungen und Vorarbeiten zur Klonierung genomischer 6/94-RNA	82
3.1.1.	Züchtung von 6/94-Viren im Hühnerei	84
3.1.2.	Isolierung der genomischen RNA des 6/94-Virus	84
3.2.	Klonierung genomischer cDNA-Fragmente des 6/94-Virus	88
3.2.1.	Synthese der ss cDNA	88
3.2.2.	Synthese der ds cDNA	92
3.2.3.	Charakterisierung der ds cDNA	96

3.2.4.	Die Klonierungsvektoren	100
3.2.5.	Ligierungsbedingungen	105
3.2.6.	Das in vitro Verpackungssystem	106
3.2.7.	Klonierung der 6/94-cDNA	107
3.2.8.	Suche nach rekombinanten Phagen mit 6/94-DNA	113
3.3.	Nachweis der Spezifität der Klone	114
3.3.1.	Southern Blot Analyse	114
3.3.2.	Northern Blot Analyse	119
3.3.3.	Dot Blot Analyse	121
3.3.4.	Zwischenzusammenfassung	123
3.4.	Zuordnung der 6/94-Klone zu den viralen Genen	123
3.4.1.	Restriktionsanalyse der klonierten 6/94-cDNA	124
3.4.2.	Hybridisierung der klonierten 6/94-cDNA mit viraler mRNA	128
3.4.3.	Sequenzanalyse der klonierten 6/94-cDNA	134
3.4.4.	Zwischenzusammenfassung	143
3.5.	Nachweis viraler Nukleinsäure in infizierten Zellkulturen	146
3.5.1.	Abschätzung der Nachweisgrenze für virale RNA	146
3.5.2.	Hybridisierung mit chromosomaler DNA infizierter Zellen	149
3.6.	Das 6/94-Virus im Tiermodell: Etablierung einer latenten Infektion	157
3.6.1.	Die akute Phase des Infektionsverlaufs	157
3.6.1.1.	Immunantwort der Mäuse auf die akute Infektion	158
3.6.1.2.	Virusspezifische Immunfluoreszenz in den Gehirnschnitten der akut infizierten Mäuse	158
3.6.1.3.	Nachweis infektiöser Viren im Überstand der Gehirn-Zellkulturen	158
3.6.1.4.	Nachweis viraler RNA in den Gehirn-Zellkulturen	164
3.6.2.	Die latente Phase der Infektion	167
3.6.2.1.	Suche nach viralem Antigen im Serum der infizierten Mäuse	168
3.6.2.2.	Test auf Expression viraler Proteine in Gehirnschnitten der Mäuse mit der Immunfluoreszenz-Technik	168

3.6.2.3.	ELISA zum Nachweis viraler Proteine aus dem Gehirn der infizierten Mäuse	169
3.6.2.4.	Nachweis der Expression viraler Proteine in den Gehirn-Zellkulturen	171
3.6.2.5.	Zwischenzusammenfassung	173
3.6.2.6.	Suche nach virusspezifischen DNA-Sequenzen in den Gehirnzellen der Mäuse	173
3.6.2.7.	Nachweis latenter, viraler RNA in den Gehirnzellen der Mäuse und in den Gehirn-Zellkulturen	174
4.	DISKUSSION	182
4.1.	Klonierung genomischer cDNA des 6/94-Virus	182
4.1.1.	Charakterisierung der 6/94-Klone	183
4.1.2.	Bedeutung des "inverted repeat" im Klon W	187
4.2.	Nachweis der 6/94-Infektion von Mäusen auf Protein-Ebene	190
4.2.1.	Infektion mit 6/94 ST-Virus	190
4.2.2.	Infektion mit den 6/94-Virusvarianten	192
4.3.	Nachweis der latenten, viralen Nukleinsäure in 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen	192
4.4.	Histologische Untersuchungen der infizierten Mäusegehirne	196
4.5.	Modell zur Latenz bei Paramyxoviren	197
4.6.	Mögliche Beziehung des 6/94-Virus zur Multiplen Sklerose	199
5.	LITERATUR	201
	ABKÜRZUNGEN	219
	DANKSAGUNG	221
	LEBENS LAUF	222

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, persistierende Infektionen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94 auf Nukleinsäureebene zu untersuchen. Aus diesem Grund sollte das virale Genom dieses Virus kloniert werden, wobei sich auf Grund der Tatsache, daß Paramyxoviren zu den Negativ-Strang-RNA-Viren gehören, verschiedene Schwierigkeiten ergeben.

Zur Synthese einer viralen cDNA, welche die Voraussetzung für die Klonierung darstellt, mußten unterschiedliche, enzymatische Reaktionen durchgeführt und optimiert werden. Als erster Schritt wurde die 6/94-RNA am 3'-Ende mit einer Poly(A)-Kette versehen, um bei der darauf folgenden Reaktion an diesem RNA-Template mit Oligo(dT) als Primer und Reverser Transkriptase die einzelsträngige (ss) cDNA synthetisieren zu können. Anschließend wurden die beiden Stränge durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt. Für die Synthese des zweiten Strangs war das Anhängen einer Poly(dC)-Kette an die ss cDNA notwendig, um dann mit Oligo(dG) als Primer und DNA-Polymerase I die Reaktion durchführen zu können. Diese doppelsträngige (ds) cDNA wurde mit S1-Nuklease behandelt, mit Hind III-Linkern versehen und in den Bakteriophagen lambda als Klonierungsvektor eingesetzt.

Es wurden drei Klone, W, C und E genannt, isoliert und anschließend charakterisiert. Durch Hybridisierungsexperimente und vor allem durch DNA-Sequenzanalyse konnten diese Klone viralen Genen zugeordnet werden. Dabei ergab sich im Vergleich mit der verwandten Sendaivirus-Sequenz, daß beide 6/94-Klone W (1,3 kb) und C (1,4 kb) die Anfangssequenz des L-Gens enthalten. Da nicht die gesamte Sequenz des Sendaivirus-Genoms bekannt ist, konnte der sequenzierte Bereich des Klon E nicht zugeordnet werden. Klon E (6,9 kb) hybridisiert nicht mit den Klonen W und C. Deshalb muß er aus einem anderen, in diesen Klonen nicht enthaltenen Bereich des 6/94-Genoms stammen. Damit repräsentieren die

drei Klone mit einer Länge von 8,3 kb etwa die Hälfte des viralen Genoms.

Die charakterisierten 6/94-Klone wurden nun zum Nachweis viraler Nukleinsäure in produktiv persistierenden und nicht-produktiv persistierenden (latenten) Infektionen eingesetzt. Produktiv persistierende Infektionen können immer an der Expression viraler Antigene erkannt werden. In latenten Infektionen, die bisher erst durch Reaktivierung des Virus erkannt werden konnten, ist dagegen keine virale Expression meßbar. Bei einer latenten Infektion wäre demnach nur noch die virale Nukleinsäure nachweisbar. Die produktiv persistierenden Infektionen wurden vor allem in Zellkultur, die latenten Infektionen in Versuchstieren (C129 Mäusen) studiert.

Die mit 6/94-infizierten Mäuse zeigten zunächst einen akuten Infektionsverlauf. Nach 70 Tagen waren dann weder Viruspartikel, noch virale Proteine in den Gehirnzellen nachweisbar. Mehr als ein Jahr nach Infektion konnte jedoch mit Hilfe der klonierten 6/94-cDNA virale Nukleinsäure, und zwar als RNA, nachgewiesen werden. Bisher stellte man sich vor, daß virale Nukleinsäure nur als DNA, entweder episomal oder ins Wirtsgenom integriert, über lange Zeit in der Zelle überdauern könnte. Die nachgewiesene, virale RNA hatte außerdem die Größe der intakten, genomischen RNA von 50S.

Der unerwartete Befund latenter, viraler RNA wirft die Frage nach Replikation und Schutz einer solchen RNA auf, denn es sind keine zellulären RNA-abhängigen RNA-Polymerasen bekannt und "nackte" RNA sollte intrazellulär sehr schnell abgebaut werden. Denkbar ist, daß durch nicht-nachweisbare Mengen an viraler Polymerase P die RNA synthetisiert wird, die durch ebenso geringe Mengen an viralem Nukleoprotein NP vor Degradationen geschützt ist. Zur Aufrechterhaltung einer viralen Latenz wären demnach nur die primär nicht-immunogenen Proteine P und NP nötig. Eine solche RNA wäre die Voraussetzung für eine Reaktivierung des Virus aus der

Latenz. Daß diese Reaktivierung bei Paramyxoviren möglich sein könnte, wurde von anderen Autoren diskutiert. Unbekannt war aber bisher, in welcher Form diese Viren in den Zellen überdauern können. In der vorliegenden Arbeit konnte für alle Negativ-Strang RNA-Viren erstmals eindeutig bewiesen werden, daß latente, virale RNA in infizierten Zellen persistieren kann. Der erkannte Mechanismus der viralen Latenz ermöglicht dem Virus das Überdauern im Organismus, ohne vom Immunsystem eliminiert werden zu können.

1. EINLEITUNG

1.1. Virusinfektionen allgemein

Die Virologie kennt heute drei verschiedene Formen viraler Infektion: Die akute, persistierende und latente Virusinfektion. In einem kurzen geschichtlichen Überblick soll die Entwicklung dargestellt werden, die von der Entdeckung akuter bis zur Kenntnis latenter Virusinfektionen in neuerer Zeit geführt hat.

1.1.1. Akute Virusinfektionen

In den Anfängen der Virusforschung stand die Entdeckung der Viren als Erreger akuter Krankheiten im Vordergrund. Damals wurde "Virus" als infektiöses Agens definiert, das nicht durch Bakterienfilter zurückgehalten werden kann. Auf diese Weise wurde der Erreger der Mosaikkrankheit von Tabakpflanzen "TMV" als Virus identifiziert (Ivanovski 1892). Es folgte das Maul- und Klauenseuchevirus, das als erstes animales Virus von Löffler und Frosch (1897) beschrieben wurde. Als erstes humanpathogenes Virus fanden Reed und Carroll (1902) den Erreger des Gelbfiebers.

Die Entdeckung der genannten Viren erfolgte stets über die Zuordnung eines infektiösen Agens zu einer akuten Erkrankung. Solchen Erkrankungen liegt in der heutigen Terminologie ein Infektionstyp zugrunde, den man als akut oder lytisch bezeichnet, und welcher zur Zerstörung der Wirtszelle führt. Diese lytischen Viren erfüllten die für bakterielle Erreger beschriebenen Koch'schen Postulate: Danach sind die Erreger im Krankheitsfalle immer nachweisbar, isolierbar, auf geeigneten Wirtszellen züchtbar und durch sie kann ein bestimmtes Krankheitsbild reproduzierbar ausgelöst werden. Die akute Infektion ruft typische Krankheitssymptome hervor und führt zur Bildung spezifischer Antikörper. Die dem Krankheitsbild zugrunde liegenden biologischen Prozesse und damit die Beziehung

zwischen Virus und Krankheit wurden auf molekularer Ebene erst ab Beginn der 50er Jahre untersucht. Von dieser Zeit an wurden in der Virusforschung in zunehmendem Maß Methoden der Biochemie und der Molekularbiologie eingesetzt, die zu Erkenntnissen über den Aufbau der Viren und ihrer Komponenten führten. Dabei wurden Methoden entwickelt, die den Nachweis und die Untersuchung viraler Proteine und Nukleinsäuren ermöglichten.

Der Verlauf einer akuten Virusinfektion wird heute folgendermaßen charakterisiert: Nach der Infektion eines Organismus vermehrt sich das Virus zunächst in den ersten Zielzellen. Nach Übertritt in die Blutbahn und Ausbreitung des Virus im Organismus kommt es zur Aktivierung des körpereigenen Immunsystems. Die Immunantwort führt in vielen Fällen zur Eliminierung des Virus und damit zur Gesundung. Die klinischen Symptome können, aber müssen nicht mit der Infektion der ersten Zielzellen beginnen und dauern unter Umständen auch nach der Eliminierung des Virus an. Man kennt solche akuten Infektionen z.B. bei den sogenannten Kinderkrankheiten, wie Masern, Mumps, Röteln, Windpocken, aber auch bei viraler Gelbsucht, grippalen Erkrankungen, Tollwut, Poliomyelitis und Gelbfieber.

Da die akuten Virusinfektionen häufig epidemisch auftreten und ein Massensterben wie bei den Pockenepidemien zur Folge haben können, konzentrierten sie zunächst das Interesse der medizinischen Forschung auf sich.

1.1.2. Produktive, persistierende Virusinfektionen

Bei akuten Virusinfektionen, die nicht zum Tod führen, wird die Virusvermehrung von Immunsystem meist schnell unter Kontrolle gebracht. Als indirekter Maßstab hierfür gilt das Ansteigen des Antikörpertiters, der nach Viruselimination wieder auf den Vor-Infektionswert abfällt.

Einige Forscher bemerkten nun aber, daß die im Verlauf

einer Virusinfektion gebildeten viralen Antikörper nach Beendigung der Krankheit oft lebenslang nachweisbar blieben. Diese erhöhten Antikörpertiter in klinisch gesunden Organismen, werteten sie als ein Indiz für ständige, wenn auch geringe Virusvermehrung. Erste direkte Hinweise auf fortdauernde Virusvermehrung erhielt Traub (1936) bei seinen Studien an der lymphocytären Choriomeningitis (LCM) von Mäusen. Er stellte fest, daß die LCM-Viren perinatal Mäuseembryos infizieren können und dann lange Zeit in diesen Tieren, die sonst keine Symptome zeigen, nachgewiesen werden können. Für dieses lange Überdauern der Viren im Organismus prägte Traub den Begriff "Virus-Persistenz".

Persistierende Infektionen werden oft erst dann entdeckt, wenn nach langer Zeit doch Symptome auftreten, welche auf eine Reaktivierung des Virus zurückzuführen sind (Evans 1984). Lange Zeit war deshalb das Ziel vieler Experimente, die Infektion nachweisbar zu machen, indem man versuchte, auf verschiedenen Wegen die Produktion infektiöser Viren zu reaktivieren und damit eine inapparente Infektion in eine apparente Infektion zu verwandeln. So konnte Good (1945) Herpesviren aus Gehirnzellen inapparent infizierter Ratten nach einem anaphylaktischen Schock isolieren.

Im Fall der persistierenden Infektion wird also das Virus nicht vom Immunsystem eliminiert, sondern verbleibt in den infizierten Zellen in einem Stadium, in dem die virale Replikation stark verlangsamt abläuft. Die virale Persistenz ist dabei immer durch mindestens eines der folgenden Kriterien nachweisbar: Durch die langsame, permanente Freisetzung von Viruspartikeln (Wolinski 1976), durch den Nachweis viraler Proteine innerhalb infizierter Zellen und auf deren Oberflächen (Koprowski 1952), oder indirekt durch den Antikörpertiter im Serum infizierter Tiere (Truant und Hallum 1977). Sofern also ein Infektionsverlauf an der Expression viraler Proteine verfolgt werden kann, wird er als produktiv persistierend bezeichnet (Koprowski 1952). Bei vielen DNA-Viren und bei Retroviren ist ein weiterer

Infektionstyp bekannt, der als Latenz bezeichnet wird. Latente Infektionen, bei denen die Expression viraler Gene fehlt -oder nicht meßbar ist- werden im Folgenden beschrieben.

1.1.3. Latente Virusinfektionen

Als Latenz wird eine nicht-produktive Virusinfektion bezeichnet (Koprowski 1982), bei der keine Expression viraler Proteine in den infizierten Zellen meßbar ist. Man muß nun im Fall einer latenten Infektion davon ausgehen, daß entweder die Menge an viralen Protein unter der möglichen Nachweisgrenze liegt oder daß tatsächlich nur noch die virale Nukleinsäure in den Zellen vorliegt.

Die Entdeckung und das Studium latenter Infektionen mußte also auf den Nachweis der viralen Nukleinsäure in infizierten Zellen abzielen. Dazu waren neue Techniken wie die der Nukleinsäurehybridisierung erforderlich. Mit diesen Methoden konnten bei DNA-Viren, z.B. Herpes simplex (Cabrere et al. 1980), virale Sequenzen im Genom infizierter Zellen gefunden werden. Aber auch bei einer Gruppe von RNA-Viren, den endogenen Retroviren (Dougherty 1966; Payne 1968), wurde virale Nukleinsäure im zellulären Genom gefunden. Hierbei handelt es sich um provirale DNA, die durch die viruseigene Reverse Transkriptase an der viralen RNA synthetisiert wird. Damit wurde in der Integration viraler DNA, die nicht zur Expression viraler Proteine führt, ein möglicher Mechanismus der latenten Virusinfektion erkannt.

Der Befund, daß auch andere RNA-Viren, wie z.B. die Masernviren, latent im Organismus überdauern können und nach langer Zeit wieder eine Krankheit, die "subakute sklerotisierende Panencephalitis" (SSPE), auslösen, macht deutlich, daß latente Infektionen auch bei RNA-Viren auftreten, die keine Retroviren sind und keine eigene Reverse Transkriptase besitzen. Möglich erscheint, daß mit Hilfe zellulärer Enzyme die virale RNA in DNA umgeschrieben

werden kann (Mondal und Hofschneider 1982), und dadurch die Integration ins Genom möglich ist. Ob das tatsächlich der Fall ist, oder ob die RNA dieser Viren durch einen anderen Mechanismus, vielleicht episomal, latent in der Zelle persistieren kann, ist noch nicht geklärt. Diese Frage wird in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Paramyxovirus 6/94 untersucht. Die Eigenschaften dieser Viren werden deshalb im Folgenden dargestellt.

1.2. Paramyxoviren

Der großen taxonomischen Gruppe der Paramyxoviridae gehören die drei Gattungen Paramyxovirus (Mumps, Newcastle Disease Virus, Parainfluenza Typ 1 bis 5, zu denen auch die Sendaiviren gehören), Morbillivirus (Masern, Hundestaupe, Rinderpest) und Pneumovirus (Respiratory Syncytial Virus) an. Paramyxoviren zeigen einige Besonderheiten bei Morphologie und Replikation.

1.2.1. Morphologie und Replikation von Paramyxoviren

Paramyxoviren haben eine annähernd kugelförmige Hülle, deren Durchmesser 150-200 nm beträgt. Die Hülle wird von einer Lipidmembran gebildet, aus der virale Glykoproteine als "Spikes" herausragen. Alle Paramyxoviren besitzen zwei Arten von "Spikes". Entweder bestehen sie aus den Proteinen Hämagglutinin und Neuraminidase (HN) oder aus dem Fusionsprotein (F). Die Innenseite der Lipidschicht ist von Matrixprotein (M) ausgekleidet. Von dieser Hülle umschlossen ist ein helikales Nukleokapsid von 18 nm Durchmesser und 1 µm Länge. Dieses Kapsid enthält neben der einzelsträngigen RNA, die vom Nukleoprotein (NP) geschützt wird, noch die Proteine P (Polymerase) und L ("Large"-Protein), denen RNA-Polymerase-Aktivität zugeschrieben wird, wobei man die Bedeutung des L-Proteins noch nicht genau kennt (Choppin und Compans 1975; Kingsbury 1972; Lynch und Kolakofsky 1978). Das L-Gen repräsentiert mit seiner Länge von mindestens 7000 Nukleotiden 44% des viralen Genoms (Amesse et al. 1982).

Paramyxoviren besitzen das längste unsegmentierte Genom unter den RNA-Viren. Die Größe ihrer RNA wurde durch Geschwindigkeitszentrifugation als 50S bestimmt, woraus sich ein Molekulargewicht von ungefähr 5×10^6 dalton (d) errechnet (Lewandowski et al. 1974). Paramyxoviren sind Negativ-Strang-RNA-Viren, d.h. ihre genomische RNA hat keine mRNA-Funktion, sondern dient als Template bei der Synthese der verschiedenen mRNAs. Bei der Replikation synthetisiert die virale Polymerase an der 50S-Negativ-Strang-RNA eine Positiv-Strang-RNA, die als Template für neue genomische RNA dient, welche nach ihrer Synthese sofort vom Nukleoprotein komplexiert wird.

Bei Paramyxoviren finden sowohl Transkription als auch Replikation im Cytoplasma der infizierten Zellen statt. Nach der Synthese der viralen Proteine werden die Oberflächenproteine HN und F an die Plasmamembran der Zellen transportiert und verdrängen zelluläre Membranproteine. Es entstehen schließlich Membranbereiche, die überwiegend oder ausschließlich virale Proteine enthalten. Anschließend führt das Matrix-Protein zur Assoziation der Nukleokapside an diese virusspezifischen Zellmembrananteile. Es beginnt der Reifungsprozeß der Viren, bei dem sich die reifen Viruspartikel durch Ausknospung ("Budding") von der Membran abschnüren.

Das "Budding" von Viren führt nicht zur Zellyse. Das ist eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung einer persistierenden Infektion. Eine weitere Eigenheit beim "Budding" ist das Einschließen unterschiedlicher Mengen an 28S und 18S ribosomaler RNA in die Virushülle (Amesse et al. 1982). Es ist deshalb zu beachten, daß bei Präparationen von RNA aus Virus-Partikeln zwangsläufig auch zelluläre Sequenzen isoliert werden, die zu unspezifischen Signalen in Hybridisierungsexperimenten mit viraler RNA führen können.

Die Gesamtdauer des Replikationszyklus eines Paramyxovirus variiert von 2,5 h bei Newcastle Disease Virus bis zu

15 h beim Sendaivirus (Kingsbury 1972).

1.2.2. Paramyxovirus-Infektionen von Zellkulturen und Versuchstieren

Die Infektion eines Versuchstieres mit Paramyxoviren verläuft zunächst akut. Sie ist durch eine Virämie gekennzeichnet und führt zu einem hohen Antikörpertiter im Serum. Wird, aus Gründen die noch zu diskutieren sind, das Virus nicht nach Ablauf der akuten Phase vom Immunsystem eliminiert, kommt es zu einer persistierenden Infektion.

Bei der Infektion von Zellen in Kultur kommt es zunächst ebenfalls zu einer akuten Phase mit einer starken Virusvermehrung, was beim überwiegenden Teil der Zellen zum Absterben führt. In den überlebenden Zellen kann das Virus persistierend überdauern. Eine produktive, persistierende Infektion bleibt dann an der Expression viraler Proteine verfolgbar. Die verschiedenen Mechanismen, welche die Persistenz von RNA-Viren erklären könnten, werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

1.2.2.1. Virale Mechanismen der Persistenz

Bei einer in Zellkultur etablierten, persistierenden Infektionen mit einer temperatursensitiven (ts) Mutante des Sendaivirus wurde bei 33°C die Freisetzung von Viren und teilweise Zellzerstörung beobachtet, während die Vermehrung der Viren und damit korrelierend auch der cytopathische Effekt bei 37°C stark reduziert ist. Daraus wurde geschlossen, daß eine persistierende Infektion auf eine ts-Mutation zurückzuführen sei, die bewirkt, daß bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C die infizierten Zellen wegen der geringen Virusvermehrung nicht zerstört werden (Kanda und Shibuta 1981).

Die Befunde von Kimura (1979) deuten darauf hin, daß die Expression des M-Proteins temperaturabhängig ist. Da dieses

Protein für das Virusassambly wichtig ist, führt bei nicht-permissiver Temperatur eine geringere Menge an M-Protein auch zu einer geringeren Produktion an Viren. Ist also die Menge an M-Protein limitiert, so begrenzt sie dadurch auch die Virusvermehrung, wodurch sich eine persistierende Infektion entwickeln kann. Mit der Temperatursensitivität als Auslösemechanismus der Persistenz können aber nicht alle Fälle von viraler Persistenz erklärt werden, wie das Paramyxovirus 6/94 zeigt. Das 6/94-Virus ist zwar temperatursensitiv, kann aber auch bei permissiver Temperatur (33°C) zur Persistenz führen. Worin die Temperatursensitivität des 6/94 begründet liegt, ist bisher nicht bekannt.

Auch in anderen Arbeiten wird das M-Protein mit der Persistenz von Paramyxoviren in Verbindung gebracht. In persistierenden Infektionen mit Sendaiviren ist die intrazelluläre Konzentration an M-Protein gegenüber akuten Infektionen stark verringert. Die Erklärung hierfür liegt in der Instabilität des M-Proteins (Roux und Waldvogel 1982; Blumberg et al. 1984). Da nun das M-Protein für die Aufrechterhaltung einer persistierenden Infektion nicht notwendig ist -es muß nicht zur Bildung infektiöser Partikel kommen-, besteht auch kein Selektionsdruck und es könnten sich Mutationen etablieren, welche die Proteinstruktur so verändern, daß das M-Protein für zelluläre Protease sensitiv wird. Daß sich Mutationen im Genom von Paramyxoviren bei persistierenden Infektionen häufig ereignen, wurde von Holland und Mitarbeitern (1979; 1982) beschrieben. Die Instabilität des M-Proteins würde eine stark verringerte oder fehlende Produktion infektiöser Partikel bewirken und dadurch die Etablierung und Aufrechterhaltung einer persistierenden Infektion ermöglichen.

Diese Arbeiten über das M-Protein bei Sendaiviren, stehen in Einklang mit Befunden bei Masernviren. Hall et al. (1979) und Choppin et al. (1981) stellten fest, daß Patienten mit SSPE, einer persistierenden Infektion mit Masernviren,

spezifische Antikörper gegen das M-Protein fehlen, während gegen sämtliche anderen, viralen Strukturproteine spezifische Antikörper nachweisbar waren.

Mit der Instabilität des M-Proteins bei persistierenden Infektionen ließen sich auch die Befunde von Kanda und Shibuta (1981) in Einklang bringen. Bei nicht-permissiver Temperatur könnte zunächst die sehr geringe Virusproduktion eine Persistenz auslösen. Würden sich dann Mutationen durchsetzen, die zu einem instabilen M-Protein führen, verstärkt sich der ts-Effekt und begünstigt die Aufrechterhaltung der viralen Persistenz. Unterschiede im M-Protein bei akuten und persistierenden Infektionen mit 6/94-Viren wurden bisher noch nicht gefunden.

Neben der Hypothese, daß ts-Mutationen und Mutationen im M-Gen zur Etablierung der Persistenz von Paramyxoviren beitragen, wird auch diskutiert, daß das Vorhandensein von defektiven, interferierenden (DI) Partikeln eine persistierende Infektion auslösen kann. DI-Partikel z.B. von Sendaiviren lassen sich durch Geschwindigkeitszentrifugation nachweisen. 1000S Virionen enthalten genomische 50S RNA und subgenomische RNA, 400S Virionen dagegen nur unterschiedlich lange subgenomische RNA.

Die Virionen mit subgenomischer RNA, deren Länge zwischen 9% und 31% des Genoms variiert (Amesse et al. 1982; Kolakofsky 1979), sind nicht infektiös. Diese DI-Partikel enthalten Sequenzen von den 3'- und 5'-Enden des vollständigen Genoms, die mittleren Genombereiche sind deletiert. In verschiedenen DI-Partikeln sind stets Teile der Gene NP und L mit unterschiedlicher Länge vertreten (Amesse et al. 1982).

Die DI-Partikel interferieren mit der Replikation vollständiger, infektiöser Virionen. Bei einer gemischten Infektion mit defektiven und vollständigen Virionen wird die defektive RNA schneller repliziert, was einen Selektionsvor-

teil für DI-Partikel darstellt (Amesse et al. 1982). Dieser Replikationsvorteil erklärt, warum bei Infektion mit hoher Multiplizität der Anteil an defektiven Viren zunimmt (Kingsbury et al. 1970; Kingsbury und Portner 1970). Die Folge ist wie beim ts-Effekt eine verlangsamte Vermehrung infektiöser Viruspartikel und damit eine Begünstigung der Persistenz (Holland und Levine 1978; Roux und Holland 1979).

Die genannten Hypothesen zum Mechanismus der viralen Persistenz mögen zur Erklärung der in Zellkultur beobachteten Phänomene ausreichend sein. Sie können aber nicht ohne Einschränkung auf das Tiermodell übertragen werden, noch sind sie für dieses hinreichend. So spielen DI-Partikel als Auslöser der Persistenz hier kaum eine Rolle, denn mit Ausnahme von LCM-Viren wurden nie defektive Partikel *in vivo*, d.h. in einem infizierten Organismus nachgewiesen (Huang 1973). Vorallem aber sind im Tierexperiment Wechselwirkungen von Organsystemen zu berücksichtigen, die in der Zellkultur ausgeschaltet sind. Außerdem bietet das Tiermodell die Möglichkeit, die Rolle des Immunsystems mit in Betracht zu ziehen. Die verschiedenen Möglichkeiten zellulärer Mechanismen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Persistenz werden im Folgenden diskutiert.

1.2.2.2. Zelluläre Mechanismen der Persistenz

Als ein zellulärer Mechanismus, welcher der viralen Persistenz zugrunde liegen könnte, wurde die erhöhte Produktion von Interferon in infizierten Zellen in Betracht gezogen (Collins und Flanagan 1977). So induzierte die intraperitoneale Injektion von mit Sendaivirus persistent infizierten BHK-21-Zellen in Mäusen eine erhöhte Interferon-Produktion (Ito et al. 1974).

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist im Immunsystem zu suchen. Bei einer akuten Infektion wird spätestens mit der Virämie eine Immunantwort ausgelöst. Hierdurch wird in der

Regel die Virusinfektion erfolgreich beendet. Man darf aber nicht übersehen, daß durch das Immunsystem unter Umständen eine Infektion auch aktiv unterstützt werden kann. So können Viren durch Makrophagen aufgenommen, aktiviert und im Organismus verbreitet werden (Verini und Lief 1979 a).

Ein besonderes Phänomen, das in diesem Zusammenhang genannt werden muß, ist das "stripping" bei Masernviren. Die Antikörper ziehen dabei die viralen Antigene aus den Oberflächen infizierter Zellen heraus. Das führt dazu, daß die infizierten Zellen nicht vom Komplement-System erkannt und nicht lysiert werden (Joseph und Oldstone 1975). Außerdem können Antikörper die Expression viraler Proteine so verändern, daß es zur Anhäufung von Nukleokapsiden in den infizierten Zellen kommt, während Oberflächenproteine nur sehr vermindert produziert werden (Fujinami und Oldstone 1979). In beiden Fällen wird die physiologische Immunantwort auf eine Infektion durch Komponenten des Immunsystems behindert oder unmöglich gemacht.

Da in mehreren Tierexperimenten die Rolle des Immunsystems in Zusammenhang mit einer persistierenden Infektion an sehr jungen Tieren getestet wurde, soll die Bedeutung der Immuntoleranz kurz angesprochen werden. An sehr jungen, z.B. LCM-infizierten Mäusen ist keine Reaktion des Immunsystems auf die Viren zu beobachten (Volkert et al. 1975). Die Erklärung dieser Tatsache ist, daß in der Phase, in der das Immunsystem lernt, zwischen fremd und eigen zu unterscheiden, das fremde Antigen schon vorhanden ist und folglich nicht bekämpft, sondern als eigen eingestuft wird. Die Immuntoleranz stellt damit einen weiteren Mechanismus dar, der zur viralen Persistenz führen kann.

Es muß außerdem diskutiert werden, ob das Immunsystem bei einer viralen Infektion unterlaufen werden kann, wenn die Antigenexpression ein bestimmtes Niveau unterschreitet. In diesem Fall wäre kein Antikörpertiter im Serum eines infizierten Tieres nachweisbar. Vorstellbar wäre, daß bei

einer viralen Infektion die Expression der immunogenen Oberflächenproteine so niedrig ist, daß es zu keiner Immunantwort kommen kann. Die Ursache hierfür könnten z.B. nur sehr wenige, schwach infektiöse Viren im Organismus sein. Solche Viren gelangen zwar durch Phagocytose in Zellen, ihre Verbreitung und Vermehrung erfolgt jedoch nicht effizient. Möglich wäre auch, daß die Expression viraler Proteine auf Grund von Regulationsmechanismen oder Mutationen stark reduziert abläuft. Solche Prozesse würden ebenfalls eine virale Persistenz ermöglichen.

1.2.3. Human-Medizinische Bedeutung persistierender Infektionen mit Paramyxoviren

Die medizinische Bedeutung persistierender Virus-Infektionen mit Paramyxoviren, die im Folgenden an einem besonders relevanten Beispiel erläutert wird, rechtfertigt eine intensive Untersuchung der Mechanismen, die einer persistierenden Infektion zugrunde liegen.

Die weitverbreitete Kinderkrankheit Masern ist eine akute Virusinfektion, die durch ein Paramyxovirus ausgelöst wird. In der Regel ist die Krankheit nach Einsetzen der körpereigenen Immunabwehr in ein bis zwei Wochen beendet. Seit 1963 gibt es routinemäßige Schutzimpfungen, die das Auftreten der Masern auf 10% verringern konnten. Damit ist diese Krankheit vom seuchenmedizinischen Standpunkt aus unter Kontrolle gebracht.

Die Masern sind aber weiterhin für die medizinische Forschung von großem Interesse. Denn Vergleiche des Erregers der SSPE, einer fortschreitenden Gehirnentzündung mit stets tödlichem Verlauf, mit dem Masernvirus haben gezeigt, daß es sich bei beiden anscheinend um das gleiche Virus handelt. SSPE tritt als seltene Spätkomplikation nach Reaktivierung des Masernvirus aus einem vermutlich latenten Zustand in der Regel 6 bis 10 Jahre nach den Masern auf. Sie trifft hauptsächlich Kinder, die Masern in den ersten zwei

Lebensjahren durchgemacht haben und zusätzlich in ländlichen Gebieten leben. Jungen erkranken 2- bis 3-mal häufiger als Mädchen. Die Krankheit äußert sich durch myoklonische Zuckungen, Ataxien, den Verlust von mentalen Funktionen und Zerrüttung des autonomen Nervensystems. Sie führt innerhalb eines Jahres zum Tod. Die Beziehung zwischen beiden Krankheiten wurde auch dadurch deutlich, daß sich seit dem Einsatz von Masern-Schutzimpfungen die Anzahl der SSPE-Fälle drastisch verringert hat (Meyermann, persönliche Mitteilung).

Vergleiche auf molekularer Ebene haben bisher keine Unterschiede zwischen Masern- und SSPE-Viren erbracht. Die Viren in SSPE-Patienten liegen aber in wenig- oder nicht-infektiöser Form vor, während die aus Masern-Patienten isolierten Viren hochinfektiös sind. Für die Erforschung der Ursache der SSPE ist es von entscheidender Bedeutung, herauszufinden, warum und wodurch das Masernvirus in den persistierenden Zustand übergeht, in welcher Form es in den infizierten Zellen überdauert und wie es viele Jahre später zum Ausbruch einer Krankheit mit tödlichem Verlauf kommt. Ist der Auslöser für diese Persistenz auf zellulärer Ebene zu suchen? Oder gibt es eine stabile Veränderung im Virus selbst? Korreliert die Fähigkeit des Virus zur persistierenden Infektion mit Mutationen im Genom?

Solche Untersuchungen setzen eine genaue Kenntnis des viralen Genoms aus akuten und persistierenden Infektionen voraus. Rozenblatt und Mitarbeiter (1982) klonierten virale mRNA aus Zellen, die akut mit Masernviren infiziert waren. Sie erhielten mehrere cDNA-Klone, deren Länge 1,75 kb nicht überschritten. Es ist aber bisher nicht gelungen, genomische RNA von Viren aus Masern- bzw. SSPE-Infektionen zu klonieren und damit die Voraussetzung für vergleichende Studien auf genomischer Ebene zu schaffen.

Dieses Beispiel macht deutlich, welche medizinische Bedeutung den persistierenden Infektionen zukommt, deren

Ansätze wir erst jetzt zu verstehen beginnen. Die zunehmende Forschung auf diesem Gebiet wird möglicherweise Spekulationen im Zusammenhang mit persistierenden Infektionen aufklären können: Sind lebenslang wirkende Schutzimpfungen vielleicht das Produkt einer persistierenden Infektion? Kann dieser Infektionstyp auch die bisher ungeklärte Ursache vieler chronischer Erkrankungen, wie z.B. Rheuma sein? Kommt manchen persistierenden Viren vielleicht sogar eine physiologische Bedeutung für den Organismus zu, vergleichbar etwa mit der Rolle der Darmbakterien?

1.3. Das Sendaivirus 6/94

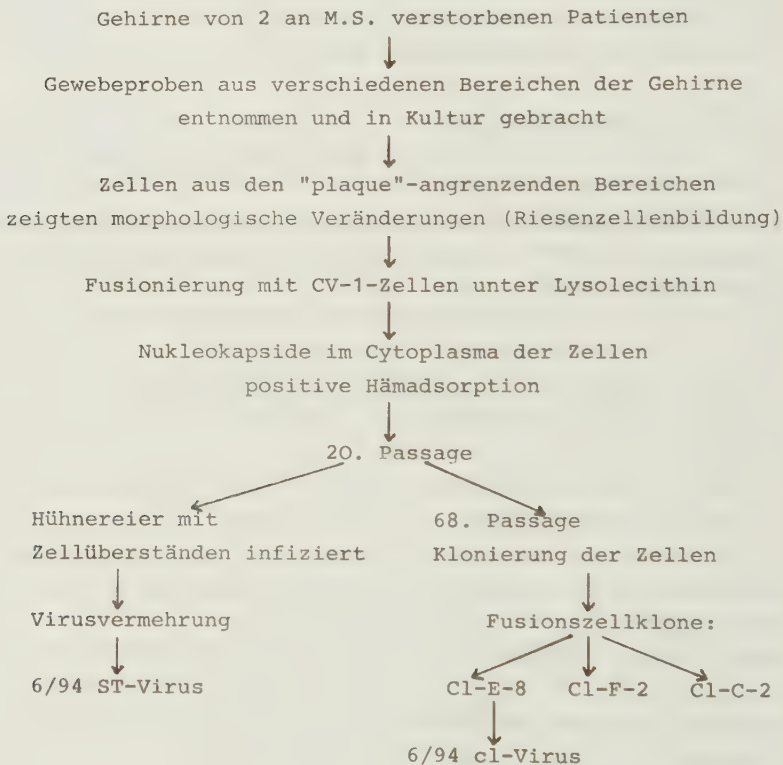
Zur Untersuchung der Mechanismen viraler Persistenz wurde in der vorliegenden Arbeit das dem Sendaivirus verwandte Paramyxovirus 6/94 gewählt. Seine Entdeckung und seine Eigenschaften, die diese Virus als besonders geeignetes Studienobjekt ausweisen, werden im Folgenden beschrieben.

1.3.1. Isolierung des 6/94-Virus aus Gehirnzellen von Multiple-Sklerose-Patienten

Das 6/94-Virus wurde im Jahr 1972 erstmals isoliert (Tabelle 1; ter Meulen et al. 1972; Koprowski und ter Meulen 1975). Dabei wurden aus dem Gehirn von zwei an Multipler Sklerose (M.S.) verstorbenen Patienten Gewebeproben von verschiedenen Bereichen in Kultur genommen. Die Zellen aus den plaque-angrenzenden Bereichen des Gehirns zeigten morphologische Veränderungen, z.B. Riesenzellenbildung, wie sie auch heute in 6/94-infizierten Zellkulturen häufig beobachtet werden können.

Nach Fusionierung der humanen Gehirnzellen mit CV-1-Zellen (Affennierenzellen) wurden Nukleokapside im Cytoplasma der Zellen entdeckt. Außerdem konnte ab der 20. Passage bei 33°C eine positive HämadSORption (HAD) mit humanen O-Erythrozyten nachgewiesen werden. In den Zellüberständen wurden infektiöse Viren gefunden, die sich in

Tabelle 1:

Geschichte der Isolierung des 6/94-Virus

bebrüteten Hühnereiern vermehren ließen und in heutiger Terminologie als 6/94 ST bezeichnet werden (vgl. Kapitel 1.3.5.). Während die bei 33°C wachsenden Zellen nahezu 100% HAD-positiv waren und hohe Sendaivirus-spezifische Immunfluoreszenz (IF) zeigten, waren die Zellen bei 37°C nur schwach positiv.

Nach der 68. Passage wurden die bei 37°C wachsenden Zellen kloniert. Drei dieser Klone, Cl-E-8, Cl-F-2 und Cl-C-2 wurden weiter untersucht. Die Zelllinien Cl-E-8 und Cl-F-2 waren deutlich HAD-positiv und zeigten Sendaivirus-spezifische Immunfluoreszenz, während bei den Cl-C-2-Zellen beide Tests negativ verliefen. Die Virusfreiheit der Cl-C-2-Zellen wurde in einer späteren Arbeit von Neubert et al. (1983) durch Hybridisierungsexperimente mit 6/94-RNA bestätigt.

1.3.2. Klassifizierung des 6/94-Virus

Die Identifizierung des 6/94-Virus erfolgte eindeutig durch Hemmung der Hämadsorption mit Immunseren gegen Parainfluenza-1-Viren. Durch verschiedene serologische Tests wurde ein Vergleich mit anderen Viren des Parainfluenza-1-Serotyps durchgeführt. Im Hämadsorptions-Hemmungstest (HAH), in der Komplement-Bindungsreaktion und im Neutralisationstest zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den mäusepathogenen Sendai-Stämmen MN und Z und zu den humanpathogenen Stämmen Obayashi und Fushimi (= Sendai D52). Das 6/94-Virus ist von Sendai-D52-Virus serologisch nicht zu unterscheiden (Lief et al. 1975) und muß mit diesem Stamm nahe verwandt sein. Die Abgrenzung des 6/94-Virus von den humanpathogenen Stämmen war erst durch einen kinetischen HAH-Test möglich (Lief et al. 1975).

1.3.2.1. Eigenschaften und Struktur des 6/94-Virus

Von den humanpathogenen Sendai-Typen unterscheidet sich das 6/94-Virus außerdem in einigen biologischen Eigenschaf-

ten: Das Temperaturoptimum für die Vermehrung des 6/94-Virus in Zellen liegt bei 33°C, d.h. 6/94 ist ein ts-Virus. 6/94 erweist sich bei der Infektion von Zellkulturen als weit weniger zelltoxisch als das Sendaivirus, wodurch die Etablierung einer persistierenden Infektion begünstigt ist. Gerade wegen seiner geringeren Virulenz, also dem veränderten Infektionsverhaltens, ist das 6/94-Virus besonders geeignet, persistierende Virusinfektionen zu verursachen.

Die bisherigen Untersuchungen der viralen Proteinen und Nukleinsäuren von Sendai- und 6/94-Viren erbrachten jedoch nur wenig Unterschiede.

Eine sehr gute Übereinstimmung zeigt sich in der Polypeptid-Zusammensetzung von Sendai- und 6/94-Viren. Die Analyse der viralen Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergibt sieben anfärbbare Banden. Die Molekulargewichte der Proteine sind für Sendai- und 6/94-Virus nahezu identisch (Lewandowski et al. 1974).

Wie das Sendaivirus enthält das 6/94-Virus als Genom eine einzelsträngige 50S-RNA von negativer Polarität. Deshalb wird in dieser Arbeit auch von einem 3'- bzw. 5'-Ende des viralen Genoms gesprochen. Aus dem 50S-Wert der genomischen RNA errechnet sich ein Molekulargewicht von ungefähr 5×10^6 d. Die Literaturangaben zur Größe des Genoms variieren von 14 bis 18 kb (Kolakofsky et al. 1974; Lewandowski et al. 1974; Shibuta et al. 1979). Von den meisten Autoren wird jedoch ein Wert von 15 kb angegeben. Wie beim Sendaivirus treten auch beim 6/94-Virus Partikel mit subgenomischer RNA (DI-Partikel) auf (Amesse et al. 1982). Hybridisierungsexperimente von Sendai-mRNA und 6/94-50S-RNA deuten darauf hin, daß mindestens 50% der Genome sequenzhomolog sind (Kolakofsky et al. 1974). Beim Vergleich der mRNAs untereinander ergibt sich sogar mehr als 50% Homologie (Beck-Brüssow, mündliche Mitteilung).

Welche genauen Unterschiede zwischen Sendai- und 6/94-Genom bestehen, ist bisher nicht bekannt. Solche Untersuchungen erfordern die Klonierung und Sequenzanalyse viraler cDNA. Shioda und Mitarbeitern gelang 1983 die Klonierung genomischer Paramyxovirus-RNA und die Sequenzanalyse der Gene NP, P und C. Diese Daten wurden zum selben Zeitpunkt veröffentlicht, als auch in der vorliegenden Dissertation schon Klonierungserfolge mit 6/94-RNA erzielt worden waren. Da die Daten von Shioda und Mitarbeitern (1983) zur Interpretation von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wichtig sind, werden sie im Kapitel 3.4. ausführlich beschrieben. Auch die Anordnung der Gene auf dem Sendai-Genom wurde erst kürzlich endgültig aufgeklärt (Amesse und Kingsbury 1982; Gupta und Kingsbury 1984) und wird wegen seiner Bedeutung für die vorliegende Arbeit im Kapitel 3.4. dargestellt.

1.3.3. Infektionsverhalten des 6/94-Virus in Zellkulturen

In Anbetracht seiner Isolierungsgeschichte werden für das 6/94-Virus stets Gehirnzellen als Zielzellen einer persistierenden Infektion angesehen. Es ergibt sich dabei die Frage, wie die 6/94-Viren zu diesen Zellen gelangen. Bogen (1977) konnte zeigen, daß menschliche Leukozyten in Zellkultur mit 6/94-Viren infizierbar sind und spekulierte deshalb, daß diese Zellen der Verbreitung von 6/94-Viren über die Blutbahn dienen. 6/94-Viren vermehren sich auch in reinen T-Lymphozyten-Kulturen aus Mäuse-Milz. Verini und Lief (1979 c) halten gerade die T-Lymphozyten, die eigentlich der Abwehr einer viralen Infektion dienen sollen, für diejenigen Zellen, welche besonders an der Verbreitung der 6/94-Viren im Organismus beteiligt sind. Bemerkenswerterweise werden Sendai-viren in Lymphozyten-Kulturen inaktiviert, während die von 6/94-infizierten Kulturen freigesetzten Viren infektiös bleiben.

Im Gegensatz zu vielen anderen Säugetier-Zellkultursystemen (Ishida und Homma 1961; Lief et al. 1975) wird die

Infektiosität des 6/94-Virus auch in Ratten-Trachea-Organ-kulturen aufrechterhalten. Wroblewska (1978) konnte zeigen, daß die 6/94-haltigen Überstände solcher Zellkulturen wieder "frische" Trachea-Kulturen infizieren können. Das 6/94-Virus ist also nach Replikation in Tracheazellen zu weiteren Zellpassagen fähig. Wroblewska hält die Tracheazellen für vielversprechende Indikatorzellen, die auch eine geringe Virusfreisetzung durch Erhaltung der Infektiosität verstärken und nachweisbar machen. Dagegen sind 6/94-Viren aus humanen Gehirnzellen und aus MDBK-Zellen ("Madin-Darby-Bovine-Kidney") für die gleiche Zellart nicht mehr infektiös (Waters et al. 1974).

Choppin und Compans (1975) erkannten, daß die Infektiosität von Sendai-Viren in infizierten Säugetier-Zellkulturen von der Spaltung des viralen Fusions-Proteins (F) durch Trypsin abhängt. Das F-Protein, ein Glykoprotein, ragt als "Spike" aus der Lipidhülle des Virus heraus und hat seine wesentliche Funktion vor allem in der Initiation des Infektionsprozesses. Es führt zunächst zur Anlagerung des Virus an Zellrezeptoren, um dann durch Fusionierung von viraler und zellulärer Membran dem Virusgenom die Penetration in das Cytoplasma zu ermöglichen. Außerdem ist dieses Protein für die Hämolyse verantwortlich (Georges 1981). Diese Aktivitäten besitzt das F-Protein jedoch nur in seiner gespaltenen Form. Durch proteolytische Behandlung oder Passage in Makrophagen können auch 6/94-Viren aus humanen Gehirnzellen und MDBK-Zellen wieder reaktiviert werden. Damit existieren auch für 6/94-Viren Hinweise, daß die Regulation der Infektiosität wie bei Sendaviren auf einer Spaltung des F-Proteins beruht (Homma 1971). Möglicherweise besitzen auch die obengenannten Tracheazellen, Lymphozyten und Makrophagen ein ähnliches proteolytisches Enzym, das die Aufrechterhaltung der viralen Infektiosität bewirkt.

Holland und Levine (1978) sehen einen Zusammenhang zwischen der Persistenz von Paramyxoviren und ihrer

Infektiosität, d.h. der Reifung des dieser Gruppe eigenen F-Proteins zu seiner gespaltenen, aktiven Form. Sendaiviren mit ungespaltenem F-Protein sind nicht infektiös (Ohuchi und Homma 1976; Scheid und Choppin 1974, 1976; Scheid et al. 1978). Sie können zwar durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden, aber durch die sehr langsame Verbreitung und Vermehrung der Viren wird der Zelltod weitgehend verhindert. So wird durch nicht infektiöse Viren eine virale Persistenz begünstigt.

1.3.4. 6/94-Virusvarianten

Mit der Beziehung zwischen Infektiosität und Persistenz von 6/94-Viren beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe anhand von sogenannten Virusvarianten, die im folgenden Kapitel kurz vorgestellt werden. Sie unterscheiden sich in einigen Eigenschaften (Tabelle 2) wesentlich von den im Ei bzw. in Zellkultur vermehrten Sendaiviren.

Aus den Fusionszellen humaner Gehirnzellen von M.S.-Patienten mit CV-1-Zellen wurde ursprünglich das 6/94 Standard (ST)-Virus freigesetzt (vgl. Kapitel 1.3.1.). Dieses Virus ist sowohl in Hühnereiern, als auch in verschiedenen Zellkulturen in hohen Titern züchtbar. Das 6/94 ST-Virus verursacht dabei zunächst eine typisch akute Infektion. Nach der Vermehrung in Zellkultur ist das 6/94 ST-Virus jedoch für weitere Zellkulturen nicht mehr infektiös. Bei Behandlung des 6/94 ST-Virus mit Trypsin wird die weitere Zell-Passage wieder möglich. Die in Eiern und in Zellkulturen vermehrten 6/94 ST-Viren besitzen also bezüglich ihrer Infektiosität die gleichen Eigenschaften wie die Viren aus akuten Sendai-Infektionen (Homma 1971, 1972; Ishida und Homma 1978).

Mit diesem 6/94 ST-Viren konnte Brüssow (1983) aber auch eine persistierende Infektion etablieren, indem er

Tabelle 2: Eigenschaften der 6/94-Virusvarianten

	6/94 ST aus dem Ei	6/94 ST aus der Zellkultur	6/94 cl	6/94 co,cl*
Vermehrung in Hühnereiern	+	+	-	-
Vermehrung in Zellkultur	+	-	-	+
Serien- Zellpassagen ohne Trypsin-Behandlung		-	-	+
Aktivierung durch Trypsin-Behandlung		+	-	-

Vero-Zellen in Kultur infizierte. Nach einer Zellkrise und dem langsamen Hochwachsen der überlebenden Zellen konnten in den Zellüberständen 6/94-Viren nachgewiesen werden, die direkt sowohl für Hühnereier als auch für weitere Zellkulturen infektiös waren. Die permanent 6/94-produzierenden Zellen werden als Zelllinie P3 bezeichnet. Das 6/94 ST-Virus kann also sowohl akute wie persistierende Infektionen auslösen.

Von Neubert und Hofschneider (1983) sind weitere Virusvarianten isoliert worden, die sich von der Zelllinie Cl-E-8 (Koprowski und ter Meulen 1975) ableiten. Diese Zelllinie entstand durch Klonierung fusionierter Gehirnzellen der M.S.-Patienten (vgl. Kapitel 1.3.1.). Von diesen Zellen werden bei 33°C in geringen Titern, aber permanent schon über Jahre hinweg, 6/94 cl-Viren freigesetzt. Die aus dieser persistierenden Infektion stammenden 6/94 cl-Viren sind aber weder für Eier noch für weitere Zellkulturen infektiös. Der wesentliche Unterschied zu den aus akuten Infektionen stammenden 6/94 ST-, Sendai- oder auch Influenza-Viren besteht in der Tatsache, daß die 6/94 cl-Viren nicht durch Trypsin-Behandlung reaktiviert werden können.

Überträgt man aber den Überstand der Cl-E-8-Zellen auf nicht-infizierte Fremdzellen und wiederholt diesen Vorgang mehrmals (Serien-Zellpassagen), so werden im Medium infektiöse Viren meßbar. Auch die Kokultivierung der Cl-E-8-Zelllinie mit verschiedenen Standard-Zelllinien, also mit "frischen", fremden Zellen, führt zur Produktion infektiöser Viren (Neubert und Hofschneider 1983). Das durch Kokultivierung aktivierte Virus wird als 6/94 co, das durch Serien-Zellpassagen aktivierte Virus als 6/94 cl* bezeichnet. Die Anzahl der infektiösen Einheiten im Überstand der kokultivierten Cl-E-8-Zellen war jedoch um vier Größenordnungen geringer als im Überstand von Zellkulturen, die mit 6/94 ST-Viren infiziert worden waren.

Alle genannten Virusvarianten aus persistierenden

Infektionen (6/94 cl, cl*, co und die P3-Viren) haben eine langsame Virusvermehrung und geringe Titer gemeinsam, was einen persistierenden Infektionsverlauf begünstigt.

1.3.4.1. Molekulare Unterschiede der 6/94-Varianten

Unterschiede auf Protein-Ebene zwischen 6/94-Viren aus akuten und persistierenden Infektionen sind bereits bekannt. Von Hönig (1983) konnte gezeigt werden, daß bei 6/94-Viren aus akuten Infektionen das F-Protein in zwei Proteine gespalten vorliegt, während die Viren aus persistierenden Infektionen ein vollständiges, ungespaltenes F-Protein aufweisen. Allerneueste Ergebnisse (Neubert, mündliche Mitteilung) geben den Hinweis, daß sich das NP-Protein aus akuten und persistierenden Infektionen im Molekulargewicht unterscheidet. Diese Befunde könnten andeuten, daß es stabile Veränderungen im Virus selbst gibt und sich möglicherweise Mutationen in bestimmten Genen mit verschiedenen Infektionstypen korrelieren lassen.

Beim Vergleich der genomischen RNA von 6/94 cl- und 6/94 ST-Viren lassen sich keine größeren Deletionen feststellen, denn 6/94 cl- und 6/94 ST-50S-RNA haben den gleichen Sedimentationskoeffizient (Neubert und Hofschneider 1983). Kleinere Veränderungen im viralen Genom, die mit dem unterschiedlichen Infektionsverhalten der Virusvarianten korrelieren könnten, lassen sich mit dieser Methode aber nicht nachweisen. Da nicht sicher ist, ob die unterschiedlichen Infektionstypen auf Mutationen zurückzuführen sind, werden die verschiedenen Viren nur Varianten genannt. Genaue Vergleiche der viralen Genome, z.B. durch Sequenz- oder Restriktionsanalysen, lassen sich nur auf DNA-Ebene durchführen und erfordern wegen der Heterogenität einer cDNA-Population die Klonierung viraler cDNA. Vom 6/94-Virus existierten aber bisher keine cDNA-Klone, die solche Untersuchungen erlauben.

Auch ein Vergleich mit dem hochinfektiösen Sendaivirus,

das im Gegensatz zum in dieser Arbeit verwendeten 6/94-Virus wesentlich zytotoxischer ist und häufig zur Zerstörung aller infizierter Zellen führt (Sugita et al. 1974), könnte zur Identifizierung der Gene führen, die vielleicht zur Persistenz beitragen.

1.3.5. 6/94-Infektionen von Versuchstieren

Der Verlauf der 6/94-Infektionen in Tieren wurde von verschiedenen Autoren folgendermaßen beschrieben (Rorke et al. 1976; Wolinsky et al. 1976; Zgorniak-Novosielska et al. 1976; Lewandowski et al. 1976; Lief et al. 1976; Gilden et al. 1976, 1978): Wenige Tage nach intranasaler (IN) oder intracerebraler (IC) Inokulation des Virusmaterials waren infektiöse Viruspartikel im Gehirn der infizierten Tiere nachweisbar. Ab dem 10. Tag und mehrere Wochen danach konnten keine infektiösen Viren mehr nachgewiesen werden. Wie am konstant hohen Antikörpertiter ersichtlich, verlief die Infektion dann produktiv persistent, d.h. es wurden zumindest virale Antigene auf den Oberflächen infizierter Zellen exprimiert. Durch Fusion der Gehirnzellen mit Fremdzellen in Kultur konnte erneut die Freisetzung infektiöser Partikel ausgelöst werden. Das Virus konnte außerhalb des Organismus wieder aktiviert werden.

Die Arbeiten über 6/94-Infektionen von Versuchstieren beschäftigen sich außerdem mit der Pathologie. Das 6/94-Virus verursacht in den Versuchstieren respiratorische und neurologische Erkrankungen, wie chronische, nekrotische und subakute Enzephalitis, Degenerationen der weißen Hirnsubstanz mit pathologischen Läsionen und perivaskuläre Infiltrate im Gehirn, vaskuläre Sklerosis und andere Symptome. Die Virulenz des Virus erwies sich in diesen Versuchen als erstaunlich hoch. So starben beispielsweise von fünf IN-infizierten Schimpansen zwei an Pneumonien und von drei IC-infizierten Tieren ein Affe an Pneumonie und ein anderer an einer neurologischen Erkrankung (Lief et al. 1976). Die IC-Inokulation von 6/94-Viren in neugeborene

Mäuse kostete innerhalb von zwei bis drei Wochen 33% der Tiere das Leben (Rorke et al. 1976). Alle überlebenden Tiere zeigten etwa ab dem 20. Tag fortdauernd während eines Untersuchungszeitraums von mehreren Wochen hohe Antikörpertiter im Serum. Bei allen genannten Versuchen war die Expression viraler Gene stets indirekt am Antikörpertiter meßbar, die Infektion verlief deshalb produktiv persistent, aber nicht latent.

1.3.6. Nachweis latenter 6/94-Infektionen

Es war also bisher im Tierexperiment nicht gelungen, den ursprünglichen, latenten Zustand des 6/94-Virus vor der Isolierung aus humanen Gehirnzellen wieder herzustellen. Es ist zwar nachträglich nicht mehr feststellbar, ob gerade die M.S.-Patienten, aus denen das 6/94-Virus isoliert wurde, Antikörper gegen Parainfluenza-Viren besaßen, die Isolierungsgeschichte zeigt jedoch, daß erst nach der Fusionierung mit CV-1-Zellen in Kultur eine positive Hämadsorption gemessen wurde (Ter Meulen et al. 1972). Aus diesen Überlegungen heraus ist es gerechtfertigt, die damalige Infektion der beiden M.S.-Patienten mit 6/94-Viren als eine latente Infektion zu bezeichnen. Zumindest aber sind dadurch positive Hinweise für die Annahme gegeben, daß eine latente 6/94-Infektion möglich ist.

Es ergeben sich nun drei wesentliche Fragen:

1. Kann eine latente Infektion überhaupt experimentell etabliert werden und auf welche Weise?

Zumindest in vitro ist dies Wroblewska und Mitarbeitern (1976) gelungen. Sie beschreiben die Infektion primärer, humaner Gehirnzellen mit 6/94-Viren in Kultur. Nach der Primärinfektion beobachteten sie in den Gewebekulturen cytopathische Effekte wie Zellverklumpung, Bildung von Vakuolen und Syncythien. Eine Stunde nach Infektion waren virusspezifische Proteine auf den Zelloberflächen durch Immunfluoreszenz und HAD-Test nachweisbar, bereits einen Tag

später waren nahezu 100% der Zellen HAD-positiv. Einige Wochen später waren aber keinerlei Virusbestandteile mehr in den Zellen nachweisbar. HAD-Test und Immunfluoreszenz blieben negativ und es waren auch keine morphologischen Veränderungen mehr an den Zellen zu erkennen. In diesem Stadium waren die Zellen nur als möglicherweise infiziert zu betrachten, da das Virus auch eliminiert worden sein könnte. Durch Fusionierung oder durch Kokultivierung kam es jedoch wieder zur Virusfreisetzung. Das Virus vermochte offensichtlich in den humanen Zellen in einen latenten Zustand überzugehen und konnte wieder reaktiviert werden.

2. Wie wäre die virale Latenz nachweisbar?

Definitionsgemäß könnte eine latente Infektion im Organismus nur durch den Nachweis viraler Nukleinsäure bewiesen werden. Ein stichhaltiger Nachweis ist deshalb nur mit einer absolut spezifischen Hybridisierungsprobe möglich, wie sie nur durch Klonieren viraler cDNA erhalten werden kann. Eine solche Nachweisprobe stand bisher aber nicht zur Verfügung. Es wurde aus diesem Grund immer wieder versucht, die Reaktivierung aus der Latenz, wie sie auch in der Isolierungsgeschichte stattfand, in einem Modellsystem nachzuvollziehen, um dadurch nachträglich den Beweis für eine vorher latente Infektion zu erbringen. Eine solche Reaktivierung konnten Wroblewska et al. (1976) zeigen. In ihrem System konnte gezeigt werden, daß 6/94-Viren in vitro in eine latente, nichtproduktive Infektion übergehen können, aus der sie wieder aktiviert werden können.

Diese Beobachtungen erinnern sehr an die Isolierung des 6/94-Virus aus dem Gehirn der Multiple-Sklerose-Patienten. In beiden Fällen wurde der Nachweis viraler Information aber nicht in der latenten Phase selbst, sondern erst nach Reaktivierung zu einer produktiven Infektion gezeigt. Die Latenz ist damit nur indirekt bewiesen. Bevor die Existenz einer latenten, viralen Information nicht direkt im Stadium der Latenz selbst bewiesen ist, besteht die Kritik, daß es sich beim indirekten Nachweis durch Virusrescue um eine

nachträgliche Viruskontamination mit 6/94-Viren handeln könnte. Auch Wroblewskas Ergebnisse lassen also nach wie vor die Frage offen, ob auch in einem intakten Organismus die Latenz als Mechanismus des Überdauerns viraler Infektion existiert und von Bedeutung sein kann. Ziel der vorliegenden Arbeit mußte also sein, eine latente Infektion zu etablieren und sie direkt nachzuweisen.

3. In welcher Form vermag bei Paramyxoviren die genetische Information in den Zellen latent zu überdauern?

Als Denkmöglichkeiten, mit denen sich bisher einige Autoren beschäftigt haben, sind die Integration viraler cDNA ins Wirtsgenom und das episomale Vorliegen von cDNA zu nennen. In der vorliegenden Arbeit soll auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß das 6/94-Virus als latente RNA in infizierten Zellen lange Zeit überdauern kann.

Untersuchungen latenter Virusinfektionen die auf den Nachweis virusspezifischer Sequenzen in der Latenzphase selbst abzielen, sind bei Paramyxoviren bisher wenig beschrieben worden. Auch wurden in diesen Experimenten nur virale RNA und nicht-klonierte cDNA als Hybridisierungsprobe eingesetzt. Die Beweiskraft solcher Experimente wird durch verschiedene Schwierigkeiten beeinträchtigt:

1. Die spezifische Aktivität bei der Markierung viraler RNA ist niedriger als diejenige, welche durch Nicktranslation von DNA erhalten wird. Dadurch ist der Nachweis viraler Sequenzen erschwert, wenn nicht unmöglich.
2. Virale genomische RNA hybridisiert wegen der gleichen Polarität nicht mit sich selbst und ist somit zum Nachweis genomischer RNA nicht geeignet.
3. Virale RNA-Präparationen sind nicht frei von Kontaminationen mit zellulären Nukleinsäuren, die ein positives Hybridisierungssignal vortäuschen können.
4. Auch virale cDNA als markierte Hybridisierungsprobe muß unter dem Vorbehalt betrachtet werden, daß die viralen RNA-Präparationen auch zelluläre Nukleinsäuren enthalten können und deshalb die Reverse Transkription auch an

kontaminierenden, zellulären Matrizen stattfindet. Solche Hybridisierungsproben sind als nicht absolut spezifisch anzusehen.

Diese Überlegungen müssen bei der Beurteilung bisheriger Hybridisierungsexperimente berücksichtigt werden. Weiss (1977) übt deshalb mit Recht Kritik an den Arbeiten von Zhdanov (1976), Simpson und Iinuma (1975), in denen der Nachweis integrierter DNA-Kopien von RNA-Viren, wie Sindbis, Masern und "Respiratory Syncytial Virus", in persistent infizierten Zellen mit viraler RNA als Hybridisierungsprobe beschrieben ist. Außerdem fanden Haase und Mitarbeiter (1981) Masernvirus-Sequenzen im Genom latent infizierter Zellen mit nicht-klonierter, viraler cDNA. Diese Ergebnisse müssen jedoch erst noch erhärtet werden, indem die Spezifität der eingesetzten Nachweisprobe durch Klonieren der cDNA erhöht wird. Da die Spezifität dieser Nachweisproben nicht absolut gesichert ist, bleibt nach wie vor die Frage offen, in welcher Form RNA-Viren außer den Retroviren in der infizierten Zelle persistieren können.

PROBLEMSTELLUNG

Am Beispiel des Sendaivirus 6/94 sollen Untersuchungen zum Mechanismus der Persistenz von Paramyxoviren durchgeführt werden. Für das Verständnis der viralen Persistenz ist es von entscheidender Bedeutung zu erfahren, wie diese RNA-Viren in den Zellen eines Organismus lange Zeit überdauern können, ohne vom Immunsystem eliminiert zu werden. Es bietet sich zu diesen Untersuchungen vorallem die latente, nicht-produktive Infektion an, bei der sich in infizierten Zellen definitionsgemäß nur noch virale Nukleinsäure, aber keine Expression viraler Proteine mehr nachweisen lassen dürfte. Die Existenz latenter, viraler Nukleinsäure konnte aber bisher noch nicht eindeutig gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb drei Fragen beantwortet werden:

1. Kann eine latente Infektion mit dem 6/94-Virus überhaupt im Tierexperiment etabliert werden?
2. Ist die virale Latenz auf molekularer Basis nachweisbar?
3. In welcher Form vermag die genetische Information von Paramyxoviren in latent infizierten Zellen überdauern?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Antibiotika

Actinomycin D	Sigma
Ampicillin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Kanamycin-Sulfat	Serva
Penicillin	Sigma
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma
Streptomycin	Sigma

Sonstige Chemikalien

Agarose	Seakem
Amberlit	Sigma
2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bromphenolblau	Serva
Caesiumchlorid	Baker Chemicals
Cethylmethylammoniumbromid	Eastman Kodak
Desinfektionsmittel Lorasol V	TAD Cuxhaven
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	Merck
Dithiothreitol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Pharmacia
Formamid (destilliert)	BRL
Glyoxal	Ega Chemie
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma
Guanidin-Isothiocyanat	Fluka
Isopropylthio-Galaktosid	Serva
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Galaktosid (X-Gal)	Biomol

Hefe-Extrakt	Difco
Na-N-Laurylsarcosin	Sigma
2-Merkaptoäthanol	Roth
Oligonukleotide	P-L Biochemicals
Oligo(dG) ₁₂₋₁₈	
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	
Polyäthylenglykol (PEG) 6000	Serva
Polyoxbethylen-Sorbitan-	Sigma
Monolaurat (Tween)	
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Serva
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
BSA, Nuklease-frei	BRL
Sucrose, RNase-frei	Schwarz-Mann
Tetramethyläthyldiamin (EDTA)	Serva
Toluol-Szintillator Xylofluor	Baker
Triton X-100	Serva
Unmarkierte	Boehringer
Deoxyribonukleosid-	
und Ribonukleosid-Triphosphate	

Radiochemikalien

alpha- ³² P-dCTP	Amersham-Buchler
gamma- ³² P-ATP	Amersham-Buchler
³ H-ATP	Amersham-Buchler
³ H-dCTP	Amersham-Buchler
³ H-dGTP	Amersham-Buchler
³⁵ S-dATP	NEN

Restriktionsenzyme

Ava II	BioLabs
Bgl II	BRL
Dde I	BioLabs
Eco RI	BRL
Hae III	BioLabs
Hind III	Boehringer, BRL

Kpn I	Boehringer
Pst I	Boehringer
Rsa I	Boehringer
Sma I	BRL
Taq I	Boehringer

Sonstige Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Beard, Life Science, St. Petersburg, Florida
E. coli DNA Polymerase I	NEN
DNase I	Boehringer
"Large Fragment" E. coli Polymerase I	BRL
E. coli Poly(A)Polymerase	BRL
Lysozym	Serva
E. coli Polynukleotidkinase	Boehringer
Pronase	Boehringer
Proteinase K	Merck
RNase A	Worthington, BRL
S1-Nuklease	Boehringer
Terminale DNA-Transferase	BRL
T4 DNA-Ligase	BRL
Trypsin	Seromed

DNA

Kalbsthymus-DNA	Serva
Lachssperma-DNA	Serva
Lambda-DNA	Boehringer
Lambda-DNA-Längenstandards I,II,III	Boehringer
Lambda 728 (Murray et al. 1977)	Murray, Heidelberg
Lambda 762 (Murray et al. 1977)	Murray, Heidelberg

Bakterien, Bakteriophagen und Plasmide

- E. coli POP 13B (lyc7, hsdR, hsdM, recA)
(erhalten von Dr. Murray EMBL, Heidelberg)
- E. coli 490 (hsdR, hsdM, recA, gal, lac, pro, leu, rpsL)
(erhalten von Prof. Dr. H. Schmieger)
- E. coli C600 (tryp, thy, leu, his, recA)
(Appleyard et al. 1954)
- E. coli 430 (hsdR, hsdM, lac)
- E. coli BHB 2688 (=N205 recA, imm434, cI_{ts}, b2, red3,
Eam15, Sam7/lambda) (Hohn 1979)
- E. coli BHB 2690 (=N205 recA, imm434, cI_{ts}, b2, red3,
Dam15, Sam7/lambda) (Hohn 1979)
- lambda 728 (Murray et al. 1977)
- lambda 762 (Murray et al. 1977)
- pBR 327 (Soberon et al. 1980)

Zellkulturen

Zelllinien	Herkunft
BSC Affennierenzellen (ceropithecus monkey kidney cells)	ATCC (American type culture collection)
BHK Hamsternierenzellen (baby hamster kidney)	ATCC
CV-1 Zellen der afrikanischen, Vero grünen Meerkatze	ATCC
Cl-E-8 mit 6/94 persistent infizierte humane Gehirnzellen, fusioniert mit CV-1 (Koprowski und ter Meulen 1975)	ter Meulen, Würzburg

Zellkulturen (laborintern)

P3 6/94 persistent
 infizierte Vero
 (Brüssow 1983)

Viren

6/94-haltige Allantoisflüssigkeit aus Hühnereiern wurde von Prof. V. ter Meulen (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Hühnereier

Befruchtete, virusfreie Hühnereier wurden zum Teil von der Firma Lohmann (Cuxhaven), zum Teil von Gut Heinrichsrh (Freising) bezogen.

Mäuse

Inzucht-Mäuse C 129 wurden von R. Jaenisch, Pethe-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt und in Martinsried weitergezüchtet.

Erythrozyten und Antikörperseren für virologische und immunologische Tests

Das für die virologischen Tests benötigte humane Blut der Gruppe O lieferte das Klinikum-Großhadern. Das Parainfluenza-1-Antiserum stammte von den Behring-Werken.

Für die direkte Immunfluoreszenz wurde Anti-Sendai-Serum gekoppelt mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) (Biomerieux) verwendet.

Medien für die Zellkultur

Als Anzuchtmedium wurde Minimal Essential Medium 199 (Eagle) der Firma Gibco verwendet. Das Medium erhielt 10% bzw. bei Primärkulturen 30% fötales Kälberserum (FKS) von Seromed. Das Serum wurde vor Gebrauch durch 30-minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert.

Chromatographie-Material

AG 501-X8(D) "Mixed Bed Resin"	Bio-Rad
Biogel A 150 m	Bio-Rad
Oligo(dT)-Zellulose, Type 7B	P-L Biochemicals

Sonstiges Material

Autoradiographie-Kassetten mit doppelter Verstärkerfolie (10-fach)	Kodak
Automatische Röntgenfilm- Entwicklermaschine X-Omat	Kodak
Dialyseschläuche PG 15-20 A, Ausschlußgrenze 10000-20000 d	Union Carbide
Elutip-Minisäulen "Gene Screen Plus"	Schleicher und Schüll NEN
Mikrotiterplatten	Nunc
Nitrozellulosefilter (Porengröße 600 nm)	Millipore
Nitrozellulose-Einmalsterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	Millipore
Röntgenfilm XAR 5	Kodak
Zellkulturflaschen (Roux)	Schott, Falcon

Rechnerprogramme

Die Auswertung der DNA-Sequenzanalyse erfolgte auf dem Computer VAX 11/782 von Digital Elektronik Corporation mit Hilfe der Programme FORTRAN-77 NAQ, Relate und SEARCH (Dayhoff et al. 1981), sowie FORTRAN-BestFit von UWGCG (Devereux et al. 1984).

2.2. Puffer und Lösungen

SSC

0,15 M NaCl

0,015 M Na-citrat

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

Puffer für Biogel A 150 m-Säule (TES)

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

0,2% SDS

STE-Puffer

0,1 M NaCl

0,01 M Tris-HCl pH 8,0

0,001 M EDTA

Puffer Z (10-fach)

200 mM Hepes pH 7,5

500 mM K-acetat

30 mM Mg-acetat

10 mM DTE

Lysopuffer

10 mM KCl
 1,5 mM Mg-acetat
 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 mM DTE

PBS-Puffer

0,1 M NaCl
 0,01 M Tris-HCl pH 8,0
 0.001 M EDTA

Verdünnungsflüssigkeit für lambda-Phagen (VFM)

1 g Bacto-Trypton
 10 g NaCl
 2,5 g MgSO_4
 ad 1 l H_2O

"Luria Broth"-Medium (LB)

10 g Bacto-Trypton
 5 g Bacto Yeast Extract
 5 g NaCl
 ad 1 l H_2O

Für lambda-Phagen zusätzlich 1 M MgSO_4

Für LB-Agarplatten:

12-15 g Bacto-Agar in 1 l LB-Medium

Für Weichagar:

0,6% Agarose in LB-Medium

Für Weichagarose:

0,6% Agarose in LB-Medium

Lambda-Phagenpuffer

3 g KH_2PO_4
 7 g Na_2HPO_4
 5 g NaCl
 1 mM MgSO_4
 1 mM CaCl_2
 0,001% Gelatine

Hochsalz-Puffer für Oligo(dT)-Zellulose-Säule

10 mM Tris-HCl pH 7,6
 500 mM NaCl
 0,1% SDS

Niedrigsalz-Puffer für Oligo(dT)-Zellulose-Säule

10 mM Tris-HCl pH 7,6
 0,1% SDS

Inkubations-Puffer für Restriktionsenzyme (10-fach)

Ava II: 60 mM Tris-HCl pH 8,0
 600 mM NaCl
 60 mM 2-Merkaptoäthanol
 120 mM MgCl_2
 1 mg/ml BSA (Nuklease-frei)

Bgl II: 500 mM Tris-HCl pH 7,5
 500 mM NaCl
 100 mM MgCl_2
 10 mM DTT

Dde I: 1500 mM NaCl
 60 mM Tris-HCl pH 7,5
 60 mM MgCl_2
 60 mM 2-Merkaptoäthanol
 1mg/ml BSA (Nuklease-frei)

Eco RI: 500 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM MgCl_2
 500 mM NaCl
 10 mM DTT

- Hae III: 100 mM Tris-HCl pH 7,5
 60 mM $MgCl_2$
 500 mM NaCl
 60 mM 2-Merkaptoäthanol
 2 mg/ml BSA (Nuklease-frei)
- Hind III: 200 mM Tris-HCl pH 8,0
 70 mM $MgCl_2$
 600 mM NaCl
 10 mM DTT
- Kpn I 60 mM Tris-HCl pH 7,5
 60 mM NaCl
 60 mM $MgCl_2$
 60 mM 2-Merkaptoäthanol
- Pst I: 500 mM Tris-HCl pH 8,0
 500 mM NaCl
 100 mM $MgCl_2$
- Rsa I: 100 mM Tris-HCl pH 7,9
 60 mM $MgCl_2$
 5 mM DTT
- Sma I: 150 mM Tris-HCl pH 8,0
 60 mM $MgCl_2$
 150 mM KCl
- Taq I: 60 mM Tris-HCl pH 7,4
 1 M NaCl
 60 mM $MgCl_2$
 60 mM 2-Merkaptoäthanol
 (Zur Inkubation mit Paraffinöl überschichten)

Elutip-Niedrigsalz-Puffer

- 200 mM NaCl
 20 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 mM EDTA

Elutip-Hochsalz-Puffer

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 M NaCl
 1 mM EDTA

Puffer für ELISA-Test

PBF-Waschlösung

0,1% BSA

0,5% FKS

in PBS

PBFT-Waschlösung

0,1% BSA

0,5% FKS

0,1% Tween 20

in PBS

Phosphat-Citrat-Puffer

34 mM $\text{H}_5\text{C}_6\text{O}_7$ 35 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2Puffer für Verpackungsextrakte (FTL)

6 mM Tris-HCl pH 7,4

18 mM MgCl_2

15 mM ATP

30 mM Spermidin pH 7,0

60 mM Putrescin pH 7,0

2% 2-Merkaptoäthanol

Puffer A

20 mM Tris-HCl pH 8,0

3 mM MgCl_2

1 mM EDTA

10 mM 2-Merkaptoäthanol

Elektrophorese-Pufferfür nicht-denaturierende Agarosegele

400 mM Tris-acetat pH 7,9

200 mM Na-acetat

20 mM EDTA

0,4 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid

Farbmarkerlösung für Agarosegele (10-fach)

20 mg/l Bromphenolblau

20 mg/l Xylencyanol

20 mg/l Orange G

10 mM EDTA

60% Sucrose

Triton-Mix

50 mM Tris-HCl pH 7,5

60 mM EDTA

2% Triton

Lysozym-Mix

25 mM Tris-HCl pH 8,0

2 mg Lysozym/ml

50 mM Glucose

10 mM EDTA

Transformations-Puffer (TCM)

10 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM CaCl_2

10 mM MgCl_2

Lösungen für Plaque-Screening

1. 0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

2. 1 M Tris-HCl pH 7,5

3. 0,5 M Tris-HCl pH 7,5

1,5 M NaCl

Waschlösungen für Nitrozellulose-Filter

1. 2 x SSC

0,5% SDS

2. 0,2 x SSC

0,1% SDS

Lösungen für Southern Blot

1. Depurination
0,25 M HCl
2. Denaturierung
0,5 M NaOH
1,5 M NaCl
3. Neutralisierung
0,5 M Tris-HCl pH 7,4
3 M NaCl

Denhardts-Lösung (Denhardt 1966) (50-fach)

- 1% BSA
1% Ficoll
1% PVP
in 3 x SSC

Hybridisierungs-Lösung für Southern Blot

- 5 x Denhardts-Lösung
5 x SSC
10 mM Tris-HCl pH 7,5-8,0
1 mM EDTA
0,5% SDS
250 mg/ml Lachssperma-DNA (ultrabeschallt)

Lösungen für die RNA-Isolierung mit Guanidin

- A. 4 M Guanidin-Isothiocyanat
25 mM Na-citrat
0,1 M 2-Merkaptoäthanol
0,5% Na-N-Laurylsarcosin
(mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt)
- B. 7,5 M Guanidin-HCl
25 mM Na-citrat pH 7,0
5 mM DTT
- C. 5,7 M CsCl
25 mM Na-acetat pH 5,0
(mit 0,2% Diethylpyrocarbonat und
durch 0,45 um Millipore-Filter sterilisiert)

Lösungen für Harnstoffgele

(Wertz et al. 1979, 1980)

Gel-Puffer

1,5% Agarose in
 6 M Harnstoff
 25 mM Zitronensäure pH 13,5
 12,5 mM beta-Alanin
 0,1% SDS

Elektrophorese-Puffer

25 mM Zitronensäure
 50 mM beta-Alanin
 0,1% SDS

Loening-Puffer (10-fach)

0,36 M Tris-HCl pH 7,8
 0,3 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 0,01 M EDTA

Harnstoff-Probenpuffer

6 M Harnstoff in Löning-Puffer
 25 mM Zitronensäure
 12,5 mM beta-Alanin
 + 1/10 Vol. Farbmarker-Lösung

Lösungen für Glyoxalgele

Elektrophorese-Puffer (TNE)

12 mM Tris-HCl pH 7,0
 6 mM Na-acetat
 0,3 mM EDTA

Gel

1% Agarose in TNE

Glyoxal-Mix

1 M Glyoxal
 12 mM Tris-HCl pH 7,0
 6 mM Na-acetat
 0,3 mM EDTA
 50% DMSO
 0,2% SDS

Neutralisations-Puffer für Northern Blot (TSN)

0,2 M Tris-HCl pH 7,5

0,15 M NaCl

1 x SSC

Formamid-Hybridisierungslösung (Thomas 1980)

50% Formamid

10% Dextransulfat

1% SDS

1 M NaCl

Inkubations-Puffer für Poly(A)Polymerase (PAP) (10-fach)

500 mM Tris-HCl pH 7,9

100 mM $MgCl_2$

2 M NaCl

10 mM DTE

Inkubations-Puffer für Reverse Transkriptase(Standardmix) (10-fach)

500 mM Tris-HCl pH 8,3

1000 mM KCl

100 mM DTE

50 mM Mg-acetat

Inkubations-Puffer fürterminale DNA-Transferase (TDT) (10-fach)

1 M K-Kakodylat pH 7,2

10 mM $CoCl_2$

2 mM DTE

Inkubations-Puffer fürPolymerase I "Large Fragment" (10-fach)400 mM KPO_4 pH 7,560 mM $MgCl_2$

10 mM 2-Merkaptoäthanol

Inkubations-Puffer für S1-Nuklease (10-fach)

300 mM Na-Acetat pH 4,6

3 M NaCl

10 mM ZnSO_4

50% Glycerin

Inkubations-Puffer für T4 DNA-Ligase (10-fach)

0,66 M Tris-HCl pH 7,0

0,1 M MgCl_2

0,01 M EDTA

0,5 M NaCl

0,1 M 2-Merkaptoäthanol

Inkubations-Puffer für Polynukleotid-Kinase (10-fach)

500 mM Tris-HCl pH 7,5

100 mM MgCl_2

50 mM DTE

Nick-Translations-Puffer (NT) (10-fach)

0,5 M Tris-HCl pH 7,8

0,1 M MgCl_2

0,1 M 2-Merkaptoäthanol

50 mg/ml BSA, Nuklease-frei

2.3. Methoden

2.3.1. Virusvermehrung im bebrüteten Hühnerei

Zur Vermehrung von 6/94-Viren werden befruchtete Hühnereier für 10 bis 11 Tage in einem Eierbrutschrank bei 37°C und 60% Luftfeuchtigkeit vorbebrütet und in bestimmten Zeitabständen automatisch gewendet. Nach Inokulation von 0,1 ml Viruslösung (etwa 1 KID 6/94 ST-Virus/Ei) in die Allantoishöhle, werden die Eier aufrecht stehend bei 33°C 4 Tage weiterbebrütet. Zur Virusernte werden die Eier entweder eine halbe Stunde bei -20°C oder 4 Stunden bei 4°C gekühlt, damit die Blutgefäße konstringieren. Dann öffnet man vorsichtig mit einer Pinzette die Eischale und saugt mit einer Pipette die virushaltige Allantoisflüssigkeit ab. Diese wird durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min. 4°C, Christ-Zentrifuge) von Zellen und Zelltrümmern befreit und kann dann entweder als Ausgangsmaterial für eine anschließende Virusreinigung oder als Impfmateriel für weitere Virusvermehrung eingesetzt werden. Die Viren können bei -120°C in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs über lange Zeit ohne merklichen Aktivitätsverlust gelagert werden (Mayr et al. 1974; Lewandowski et al. 1974).

2.3.2. Virologische Tests

2.3.2.1. Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest (HA-Test) dient der quantitativen Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten (HA) einer Viruslösung. Der Test wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. In jede Vertiefung wird zunächst 25 µl PBS vorgegeben. In 2er-Stufen wird eine Virusverdünnungsreihe mit je 25 µl Viruslösung pro Vertiefung angelegt. Nach Zugabe von je 25 µl 1%iger human-O-Erythrozytenlösung und Inkubation bei 4°C für 1 h ist der Test ablesbar. Man spricht z.B. von 2 HA/ml, wenn bei der Verdünnungsstufe 1:2 noch eindeutig positive Hämagglutination zu erkennen ist. 1

HA (bezogen auf 25 μ l) entspricht dabei ungefähr 10^7 6/94-Viruspartikeln.

2.3.2.2. Kulturinfektionsdosistest

Mit dem Kulturinfektionsdosistest (KID-Test) lässt sich die Infektiosität eines Virusmaterials bestimmen (Channock und Johnson 1964). Zunächst wird in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte 25 μ l Zellkulturmedium vorgelegt. Dann wird in 2er-Stufen eine Virusverdünnung mit 25 μ l pro Vertiefung angelegt und 50 μ l Zellsuspension ($7,5 \times 10^3$ Zellen) zugegeben. Das Gemisch aus Zellen und Viren wird bei 37°C für 24 h inkubiert. Nach Zugabe von 25 μ l 1%iger humaner O-Erythrozyten-Lösung erfolgt bei 4°C für 1 h die Hämaadsorbtion. Zellsuspension und Erythrozytenlösung müssen auf ihre Virusfreiheit kontrolliert werden. Eine KID ist die Virusverdünnung, bei der der virale Effekt, nämlich die Hämaadsorbtion, gerade noch erreicht wird.

2.3.2.3. Hämaadsorptionstest

Das Prinzip des Hämaadsorptionstests (HAD-Test) beruht auf einer Adsorption von Erythrozyten an die Membran von Zellen, die mit hämagglutinierenden Viren infiziert sind. Man weist nach, ob in kultivierten Zellen virale Oberflächenantigene exprimiert werden, d.h. ob die Zellen produktiv infiziert sind (direkter HAD-Test; Neubert et al. 1983). Er dient auch dazu, einen Zellüberstand auf Infektiosität für Indikatorzellen zu untersuchen (indirekter HAD-Test; Neubert und Hofschneider 1983).

2.3.2.3.1. Direkter Hämaadsorptionstest

Die zu testende Zellkultur wird mit einer 1%igen human-O-Erythrozytenlösung überschichtet und 1 h bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Erythrozyten werden durch mehrmaliges Waschen des Zellrasens mit kaltem PBS entfernt. Das Ausmaß der Hämaadsorbtion wird im Mikroskop untersucht,

indem der Prozentsatz hämadsorbierender Zellen bestimmt wird.

2.3.2.3.2. Indirekter Hämadsorbitionstest

Der Zellübestand, der mit diesem Test auf infektiöse Viren untersucht werden soll, wird zunächst durch niedertourige Zentrifugation von freischwimmenden Zellen befreit und dann im Ti 45-Rotor der Beckman-Zentrifuge bei 30000 rpm für 40 min. bei 4°C konzentriert. Mit diesem Konzentrat werden BHK-21-Indikatorzellen infiziert. Nach Inkubation bei 33°C für 7 Tage wird der Zellrasen mit PBS gewaschen und, wie beim direkten Hämadsorbitionstest (Kapitel 2.3.2.3.1.) beschrieben, mit Erythrozytenlösung weiterbehandelt. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der hämadsorbierenden Zellen im Mikroskop.

2.3.2.4. Virusspezifische Immunfluoreszenz

Für die direkte Immunfluoreszenz (IF) wurden Zellen in Petrischalen gezogen, mit PBS gewaschen und mit 95% Äthanol fixiert. Nach Inkubation mit einer 1/10 Verdünnung von Anti-Sendai-FITC-Antiserum 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde wiederum mit PBS gewaschen. Mit Glyzin/PBS (1:9) und einem Deckgläschen abgedeckt wird das Präparat unter einem Leitz Ortholux Mikroskop untersucht.

2.2.2.5. Hämagglutinations-Hemmungstest

Bei Reaktion von Viren mit einem homologen Antiserum kommt es zu einer Hemmung der Agglutination der Viren mit bestimmten Erythrozyten. Der Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) (Mayr et al. 1977) ermöglicht eine Untersuchung des Blutserums infizierter Tiere auf hämagglutinations-hemmende, virale Antikörper. Vom Serum wurde in einer Verdünnungsreihe je 25 ul PBS in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 4 HA 6/94 ST-Virus in 25 ul Virussuspension bei 22°C für 60 min. inkubiert. 4 HA ist die Virusmenge, die

ohne Antiserum mit 4-facher Sicherheit eine positive Hämagglutination ergibt. Nach Zugabe von 25 μ l einer 1%igen human-O-Erythrozytenlösung sedimentieren in 60-90 min. bei 4°C die ungebundenen Erythrozyten. Als HAH-Titer des Serums gilt der reziproke Wert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der die Hämagglutination gerade noch aufgehoben ist. Als positives Kontrollserum wurde das "Parainfluenza-1" Antiserum der Behringwerke eingesetzt.

2.3.2.6. ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ermöglicht den Nachweis viraler Proteine durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion (Engvall and Perlmann 1972; Crowther und Abu-el Zein 1979). Die Proteinproben werden in PBS/0,1% SDS gelöst und in speziell beschichteten Mikrotiterplatten als Protein-Verdünnungsreihe in PBS vorgelegt. Dabei sollte die gewünschte Proteinmenge in 50 μ l enthalten sein. In einer feuchten Kammer bei 37°C läßt man die Proteine an die Beschichtung adsorbieren. Noch freies Protein wird durch Waschen mit PBF entfernt. Um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen, wird noch 90 min. bei 37°C mit jeweils 100 μ l 3% BSA in PBS inkubiert und dann wie beschrieben gewaschen. Das Parainfluenza-1-Antiserum vom Meerschweinchen, das einen Komplementbindungstiter von 1:80 aufweist, wird in PBF 1:50 verdünnt und zur Reaktion mit dem Antigen 50 μ l dieser Verdünnung pro Vertiefung eingesetzt. Nach 2 h bei 22-25°C wird überschüssiger, nicht gebundener Antikörper mit der Waschlösung PBFT entfernt. Kaninchen-Anti-Meerschweinchen-Antikörper sind an Meerrettichperoxidase gekoppelt (Childs und Bradsley 1975). Sie werden 1:400 in PBF verdünnt und 50 μ l pro Vertiefung zur Reaktion bei 22-25°C 90 min. eingesetzt. Zunächst wird dann mit PBFT, dann aber noch zusätzlich mit Phosphat-Citrat-Puffer gewaschen. In diesem Puffer löst man (1 mg/ml) 2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure), gibt bis 0,03% Endkonzentration H_2O_2 zu und setzt von diesem Gemisch 50 μ l pro Ansatz ein. Nach

etwa 10 min. mißt man bei einer Wellenlänge von 450 nm, bei welcher der in der Reaktion freigesetzte Farbstoff absorbiert.

2.3.3. Reinigung von 6/94-Viren aus Allantoisflüssigkeit

Die Reinigung der Viren erfolgte in Abwandlung eines Standardverfahrens (Mayr et al. 1977). Die bereits niedertourig abzentrifugierte, virushaltige Allantoisflüssigkeit wird im Ti 45-Rotor der Beckman-Zentrifuge bei 28000 rpm für 40 min. bei 4°C konzentriert. Die Viren werden dann durch eine 25%ige Sucroseschicht sedimentiert, wobei vor allem Protein-Verunreinigungen abgetrennt werden. Dazu schichtet man in SW 50-Röhrchen auf 1 ml 25%ige Sucroselösung (wt/wt) in PBS die Virussuspension und zentrifugiert mit 30000 rpm für 45 min. bei 4°C. Das Virus-Pellet wird in PBS vorsichtig resuspendiert. Lösen sich die Virusaggregate nicht, so wird mit einem Douncer L etwa 10-mal homogenisiert und niedertourig abzentrifugiert. Es können alternativ die Viren durch eine 25%ige Sucroseschicht auf ein 60% Sucrosekissen sedimentiert und dadurch gereinigt werden. Da ihre Dichte geringer ist, als die der Zuckerlösung, können sie nicht in die 60%-Schicht eindringen. Ein Zusammenballen der Viren am Röhrchenboden, bei dem eine große Zahl von Viruspartikeln deformiert und damit inaktiviert würde, wird hierbei vermieden.

Der Überstand der niedertourigen Zentrifugation bzw. die Virusbande aus dem Stufengradient wird anschließend auf einen linearen Dichtegradienten aus 25-60%iger Sucrose in PBS geschichtet. Dabei trennen sich leere Virushüllen und Viren anderer Dichte von der Virussuspension. Nach 16 h im SW 25-Rotor einer MSE-Ultrazentrifuge bei 20000 rpm (4°C) entsteht eine deutlich sichtbare, weißliche Virusschicht aus Partikeln gleicher Dichte. Die Virusbande wird mit der Pasteurpipette abgenommen, wegen des hohen Sucrosegehalts stark in PBS verdünnt, nochmals im SW 25-Rotor mit 45000 rpm für 90 min. bei 4°C pelletiert und zuletzt in STE

aufgenommen.

2.3.4. RNA-Extraktion aus gereinigten Viruspartikeln

Zu den gereinigten, in STE aufgenommenen Viren wird das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bis zu einer Endkonzentration von 0,1%, sowie das proteolytische Enzym Pronase oder Proteinease K in einer Endkonzentration von 0,2-0,5 mg/ml zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min. bei 37°C. Anschließend wird die SDS-Konzentration auf 2% erhöht und mit gleichem Volumen STE-gesättigtem und mit NaOH neutralisiertem Phenol Proteine von Nukleinsäuren getrennt. Die wässrige Phase, die die Nukleinsäure enthält, wird noch 2-mal phenolisiert. Mit gleichem Volumen Chloroform entfernt man bei 2-maliger Wiederholung das Phenol, das sich im Chloroform löst. Die wässrige Phase wird mit 2,5-fachem Volumen absolutem Äthanol und einer NaCl-Konzentration von 300 mM versetzt. Verbliebenes Chloroform löst sich im Äthanol. Bei -20°C fällt die Nukleinsäure, die dann in der Sorvall-Zentrifuge für 15 min., 9800 g, -20°C pelletiert wird. Nach dem Trocknen wird das Pellet im Exsikkator getrocknet, in STE-Puffer gelöst und nochmals mit Äthanol gefällt. Die RNA wird, um Degradationen zu vermeiden unter Äthanol bei -20°C gelagert. Von der so gereinigten Gesamt-RNA kann nun die hochmolekulare, genomische RNA der 6/94-Viren abgetrennt werden.

2.3.5. Isolierung genomischer RNA des 6/94-Virus

Zur intensiven Reinigung der viralen RNA von möglichen, zellulären Verunreinigungen wurde die genomische 6/94-RNA nach ihrem Sedimentationswert aufgetrennt. Die Sedimentationskonstante zellulärer RNA liegt in der Regel unter 35S. Zum Abtrennen von viraler 50S-RNA wurden kontinuierliche Sucrose-Gradienten verwendet. Dazu überschichtet man die RNA-Probe auf einem linearen Sucrose-Gradienten von 5-20% (wt/wt) in STE-Puffer mit 0,1% SDS und zentrifugiert im SW50-Rotor einer Beckman-Ultrazentrifuge für 80 min., bei

17°C und 45.000 rpm. Anschließend wird der Gradient in eine Abtropfvorrichtung eingespannt und nach Durchfluß durch ein Spektralphotometer (LKB-Uvicord, 260 nm Wellenlänge) mit dem Fraktionssammler (LKB-Ultrarac) in hochmolekulare und niedermolekulare RNA-Fractionen aufgeteilt. Als hochmolekulare 50S-RNA gelten, verglichen mit der ribosomalen RNA, die Fractionen, die über einem S-Wert von 35S liegen.

2.3.6. Zellkultivierung

Die Zellen wurden im Minimum Essential Medium 199 (MEM 199; Eagle) mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum in 175cm² Plastik-Roux-Flaschen in einem Brutschrank bei 37°C bzw 33°C mit 5% CO₂-Atmosphäre gezogen. Bei vollgewachsenem Zellrasen passagiert man die Zellen, d.h. man gießt das Medium ab, wäscht mit 0,25%igem Trypsin in PBS Serumreste, die die Aktivität der Protease hemmen würden, ab und inkubiert mit frischem Trypsin je nach Zelltyp 15 min. bis zu mehreren Stunden bei 37°C. Die durch die Protease vom Boden der Flasche abgelösten und vereinzelt Zellen werden im Medium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt, oder in MEM 199 mit 10% DMSO, 15% Serum in einem speziellen Einfriergerät (Cryoson) eingefroren.

2.3.6.1. Anlegen von Primärkulturen

Zunächst werden die entsprechenden Organe des Versuchstieres entnommen und in PBS mit Penicillin und Strptomycin gewaschen. Das Gewebe wird je nach Festigkeit mit einer sterilen Schere oder einem Skalpell zerkleinert und in 0,25%igen Trypsin für 5-10 min. bei 37°C inkubiert. Die trübe Zellsuspension saugt man mit der Pasteurpipette ab und stoppt den proteolytischen Abbau durch Zugabe von kaltem fötalem Kälberserum. Man wiederholt die Trypsin-Behandlung mit den verbliebenen Geweberesten 2- bis 3-mal. Bei zu langer Trypsineinwirkung werden die Zellen zerstört. Die Zellen werden bei 1000 rpm 5 min. pelletiert und in MEM 199 mit 30% fötalem Kälberserum und 100 U/ml Kanamycin-Sulfat in

Kulturflaschen eingesät. Embryonale und Zellen neugeborener Tiere wachsen dabei schnell und zu einem hohen Prozentsatz an, während Zellen aus dem Gewebe erwachsener Tiere kokultiviert werden müssen. Man gibt dazu die trypsinierten Zellen auf einen bereits vorhandenen dünnen Zellrasen. Beim Anlegen von Primärkulturen ist die Zugabe von Antibiotika nützlich. Nach einem Tag wird das Medium gewechselt und damit die nicht angewachsenen Zellen entfernt.

2.3.6.2. Infektion von Zellkulturen mit 6/94-Viren

Zur Infektion von kultivierten Zellen mit Viren entfernt man das Medium, wäscht den Zellrasen mit PBS nach und gibt 1 ml hochkonzentrierte Virussuspension zu, etwa 80.000 KID pro vollbewachsene Roux-Flasche, entsprechend einer $MOI=0,01$, falls nicht anders angegeben. Dann läßt man die Viren eine Stunde an die Zellen adsorbieren, nimmt den Überstand ab und gibt frisches Medium zu. Nach zwei bis drei Tagen zeigt sich ein cytopathischer Effekt in Form von Syncytienbildung, die durch Fusion einzelner Zellen entsteht. Bevor sich die infizierten Zellen abzulösen beginnen, in Abhängigkeit von der moi nach 2 bis 3 Tagen, nimmt man die virushaltigen Überstände ab und verarbeitet sie weiter, oder man extrahiert die Nukleinsäuren aus den infizierten Zellen, wie im Kapitel 2.3.8. beschrieben.

2.3.7. Versuchstiere

C 129-Mäuse wurden bei $26^{\circ}C$ und 60% Luftfeuchtigkeit unter speziellen pathogen-freien Bedingungen gehalten (SPF).

2.3.7.1. Infektion von Versuchstieren mit 6/94-Virus

Konzentrierte 6/94-Viren werden in 30 μ l PBS suspendiert und in die rechte Gehirn-Hemisphäre von Mäusen inokuliert, die unter einer leichten Äthernarkose stehen. Zur Infektion wurden 6-8 Wochen alte Mäuse verwendet, da in diesem Alter die Schädeldecke noch weich genug für den Einstich ist, die

Tiere sich aber schon außerhalb der immuntoleranten Phase befinden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Tiere mit einer Dosis von 5×10^5 KID pro Maus infiziert.

2.3.8. Extraktion von Nukleinsäuren aus Zellkulturen und Geweben

2.3.8.1. Extraktion von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA dürfen die Zellen nicht mit Trypsin behandelt werden, da die verwendete Protease mit RNasen verunreinigt ist (Neubert, mündliche Mitteilung). Deshalb werden kultivierte Zellen mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturflasche abgekratzt, Gewebe zunächst mechanisch zerkleinert und die Zellen dann mit einem Douncer homogenisiert. Entsprechend der Methode von Chirgwin (1979) werden die Zellen nach dem Pelletieren (200 g 5 min.) mehrmals mit PBS gewaschen und in Guanidin-Isothiocyanat-Lösung A aufgenommen ($1 \text{ ml}/1 \times 10^7$ Zellen). Das Gemisch wird auf ein 1 ml CsCl-Kissen (Lösung C) in einem Beckman SW 60 Polyallomer-Zentrifugenröhrchen geschichtet und mit Guanidin-Isothiocyanat-Lösung A bis zum Rand aufgefüllt. Die Guanidin-Konzentration darf nicht erniedrigt werden, da sonst die denaturierende, RNase-hemmende Wirkung beeinträchtigt wird. Durch eine Zentrifugation im SW 60 Rotor bei 36000 rpm 20°C 15 h wird nur die RNA sedimentiert, die DNA verbleibt wegen ihrer niedrigeren Dichte auf dem CsCl-Kissen und wird quantitativ abgetrennt. Das RNA-Pellet wird zum Entfernen des CsCl mehrmals mit Guanidin-Hydrochlorid-Lösung B gewaschen und in 1 ml dieser Lösung aufgenommen. Durch Zusatz von 25 μl 1 M Essigsäure erfolgt eine pH-Änderung von 7 auf 5. Die RNA wird dann mit 0,5 ml Äthanol gefällt, das restliche Guanidin mit Äthanol ausgewaschen und die RNA unter Alkohol bei -20°C gelagert. Zum Einsatz in einem Experiment wird sie abzentrifugiert (9800 g, 15 min.), im Exsikator getrocknet und entsprechend gelöst.

2.3.8.2. Extraktion von cytoplasmatischer RNA

Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren aus dem Zellkern und aus dem Cytoplasma getrennt. Zunächst werden, wie in 2.3.8.1. beschrieben, die Zellen mit PBS gewaschen und bei 200 g 5 min. sedimentiert. Das Zellpellet wird in hypotonischen Lyso-Puffer ($2 \text{ ml}/4\text{-}8 \times 10^7$ Zellen) aufgenommen und die Zellsuspension auf Eis im Douncer homogenisiert. Nach etwa 5 min. gibt man zu den lysierten Zellen hypertonen Puffer Z zu ($200 \text{ ul}/4\text{-}8 \times 10^7$ Zellen) und zentrifugiert bei 9800 g 10 min. 4°C . Das Pellet enthält nun die Zellkerne, Mitochondrien und Membranteile, während die cytoplasmatischen Nukleinsäuren, also vor allem die RNA, im Überstand bleiben. Nach Zugabe von SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,1% und Inkubation mit 0,5 mg/ml Pronase (1 h, 37°C) wird die Nukleinsäure phenolisiert, chloroformiert und mit Äthanol gefällt.

2.3.8.3. Extraktion von chromosomaler DNA

Aus den im Kapitel 2.8.2. pelletierten Zellkernen erfolgt die Extraktion chromosomaler DNA. Das Kernpellet wird in STE aufgenommen ($2 \text{ ml}/4\text{-}8 \times 10^7$ Zellen) und dann die DNA wie die cytoplasmatische RNA weiterbehandelt.

2.3.8.4. Extraktion von viraler mRNA aus 6/94-infizierten Zellkulturen

BSC-Zellen werden mit 6/94-Viren ($\text{MOI} = 1\text{-}2$) infiziert. Bei auftretendem cytopathischen Effekt wird nach etwa 90 min. Kulturmedium mit 2% FKS zugegeben. 2-3 h nach Infektion wird Actinomycin D in einer Endkonzentration von 2 ug/ml zugesetzt. Die hohe Infektionsdosis und die Wirkung des Actinomycin D führt verstärkt zu cytopathischen Effekten. Deshalb wird bei dieser Methode schon nach spätestens 24 h die Gesamt-RNA aus den infizierten Zellen, wie im Kapitel 2.3.9.1. beschrieben, isoliert. Soll die RNA radioaktiv markiert werden, wird 5-6 h nach Infektion ^3H -Uridin (500

uCi/ 10^7 Zellen) zugegeben. Die spezifische Aktivität des ^3H -Uridin betrug 50 Ci/mmol. Nach Extraction der Gesamt-RNA wird über eine Oligo(dT)-Zellulose-Säule die poly(A)-haltige RNA durch Affinitäts-Chromatographie abgetrennt. Man wäscht das Säulenmaterial zunächst mit Hochsalz-Puffer, dann mit 0.1 M NaOH, neutralisiert mit H_2O und equilibriert wieder mit Hochsalz-Puffer. Die RNA-Probe wird zunächst in Niedrigsalz-Puffer gelöst, dann mit NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 M gebracht und auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf der Säule wird durch ein UV-Spektralphotometer, das auf einem Kurvenschreiber die Extinktion bei 260 nm anzeigt, verfolgt. Die nicht gebundene, nicht-poly(A)-RNA wird mit 7 ml Hochsalz-Puffer durch die Säule gewaschen. Dann erfolgt mit 7 ml Niedrigsalz-Puffer die Elution der mRNA, die gesammelt und mit Äthanol gefällt wird. Eine höhere Trenn-Effektivität wurde erreicht, wenn man das RNA-Eluat ein zweites Mal über die Säule schickt.

2.3.9. Extraktion von Proteinen aus Viren, Zellkulturen und Geweben

Ausgangsmaterial für die Proteinextraktion sind entweder gereinigte Viren nach dem linearen Dichtegradienten (Kapitel 2.3.3.) oder Suspensionen von Zellen aus Kultur bzw. Gewebe nach dem Homogenisieren und Waschen in PBS (Kapitel 2.3.8.1.). Die in STE-aufgenommene Virus- bzw. Zellsuspension wird mit SDS versetzt, das bei einer Endkonzentration von 2% Viren und Zellen lysiert. Bei Inkubation in 37°C für 12-24 h werden die Sekundärstruktur der Proteine aufgelöst. Beim anschließenden Phenolisieren werden die Proteine von den Nukleinsäuren getrennt. Aus der Phenolphase, in der die Proteine gelöst sind, werden durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an Aceton, das mit 0,1 M Eisessig versetzt ist, bei 4°C die Proteine ausgefällt. Nach niedertouriger Zentrifugation nimmt man den Überstand ab und trocknet das Pellet im Exsikator, wobei Aceton-Reste entfernt werden. Das Sediment wird in PBS/0,1% SDS aufgenommen.

Die Proteinkonzentration wird nach der Methode von Warburg bestimmt. Man setzt die Extinktion (E) einer Wellenlänge von 280 nm, bei der sowohl aromatische Aminosäuren wie Nukleinsäuren absorbieren, in Beziehung zu der Absorption bei 260 nm (hier absorbieren nur die Nukleinsäuren). Im mg/ml errechnet sich der Gehalt an Protein nach der Formel:

$$1,55 \times E_{280 \text{ nm}} - 0,76 \times E_{260 \text{ nm}}$$

2.3.10. Gelelektrophoresen zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA eignen sich nicht-denaturierende Gele; für RNA sind wegen ihrer Einzelsträngigkeit und der damit verbundenen Neigung zur Selbsthybridisierung denaturierende Bedingungen zu bevorzugen.

2.3.10.1. Nicht-denaturierende Agarosegele

In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8%, 1% und 1,5% Agarosegele verwendet, welche in den Bereichen 0,7-8,0 kb, 0,5-7 kb und 0,1-3 kb DNA-Fragmente effizient auftrennen (Maniatis et al. 1982). Als Längenstandard wurden meistens Hind III-verdaute lambda DNA-Fragmente mit 23,7 kb, 9,46 kb, 6,67 kb, 4,46 kb, 2,25 kb, 1,96 kb, 0,59 kb und 0,1 kb verwendet. Für ein analytisches Gel wird die Agarose in Elektrophorese-Puffer aufgeköcht, auf 65°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Bei 0,8-1% Agarosekonzentration wurde ein horizontales, etwa 0,5 cm dickes Gel gegossen, während bei höherer Konzentration die Elektrophorese in vertikaler Lage und 3 mm Geldicke durchgeführt wurde. Nach etwa 1 h ist die Agarose erstarrt und das Gel kann beladen werden. Die Elektrophorese dauerte bei 45V 15 h oder bei 100V 5 h. Präparative Gele wurden erst nach Beendigung der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht sie bei kurzzeitigem UV-Licht in Form von fluoreszierenden Banden im Gel sichtbar, die durch einen Rotfilter mit

Polaroid- oder Ilford PANF-Film photographiert werden.

Die zu trennenden DNA-Fragmente werden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Farbmarkerlösung vermischt. Die enthaltene Sucrose beschwert die Proben in der Geltasche. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 0,5-1 µg Phagen- oder Plasmid-DNA aufgetragen.

2.3.10.2. Denaturierende Agarosegele

2.3.10.2.1. Glyoxalgele

Die RNA wird im Glyoxal-Mix 15-30 min. bei 50°C denaturiert und nach dem Abkühlen mit Farbmarkerlösung versetzt. Das 1%ige Agarosegel (Dicke 5-6 mm) wird mit TNE-Elektrophorese-Puffer hergestellt. Die Elektrophorese findet in dem gleichen Puffer bei 50V 5 h statt. Für die denaturierende Wirkung ist es entscheidend, die Glyoxallösung zu deionisieren und sie über Ionenaustauscher (Amberlit) bei 4°C oder deionisiert in -20°C eingefroren zu lagern (McMaster und Carmichael 1977). Da ein pH von 8 nicht überschritten werden darf, muß der Elektrophorese-Puffer mittels einer Pumpe ständig umgewälzt werden. DNA und RNA kann in Glyoxalgelen sehr schlecht mit Ethidiumbromid angefärbt werden und läßt sich vor allem nach dem Färben nicht mehr effizient auf Filtermembranen transferieren.

2.3.10.2.2. Harnstoffgele

Man kocht 1,5% Agarose in H₂O auf, kühlt auf etwa 70°C ab und mischt den denaturierend wirkenden Harnstoff, Na-Citrat und SDS in den im Kapitel 2.2. angegebenen Endkonzentrationen zu. Die Geldicke betrug 2-3 mm. Das horizontale Gel läßt man nach dem Gießen etwa 2 h bei 4°C erstarren. Die RNA wird in Proben-Puffer aufgenommen, mit Farbmarkerlösung versetzt und bei 20mA etwa 16 h elektrophoretisch aufgetrennt (Wert und Davis 1979; Wert et al. 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Harnstoffgel zur Analyse ^3H -markierter mRNA verwendet. Hierzu muß das Gel fluorographiert werden. Man wäscht mit kaltem Elektrophorese-Puffer, legt das Gel dann mindestens 30 min. in Methanol (p.A.), dann für weitere 30 min. in 10% 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in Methanol und wäscht zum Schluß mit H_2O , wobei PPO im Gel weiß ausfällt. Das PPO dient als Szintillator. Das Gel wird auf Whatman 3 MM-Papier 3 h bei 60°C an der Wasserstrahlpumpe getrocknet und bei -80°C autoradiographiert. Die Exposition erfolgte etwa 3 Tage in Röntgenfilm-Kassetten mit Verstärkerfolie.

2.3.11. Synthese doppelsträngiger, viraler cDNA

Als Ausgangsmaterial zur Synthese viraler cDNA dient genomische, im Sedimentationsgradienten (Kapitel 2.3.5.) abgetrennte 6/94 ST-RNA. Die Alkohol-gefällte Nukleinsäure wird bei 4°C in H_2O aufgenommen. Hochgereinigte RNA löst sich sofort.

2.3.11.1. Polyadenylieren

In einem Polyadenylierungs-Ansatz von 100 μl wurden maximal 10 μg 6/94 ST 50S-RNA eingesetzt. Folgende Standard-Bedingungen, im Wesentlichen nach Sippel (1973), wurden gewählt:

PAP-Puffer (10-fach)	1/10 Vol.
MnCl_2	2 mM
BSA	4 mg/ml
^3H -rATP	13 μM
(23 Ci/mmol)	
(1 mCi/ml)	
rATP	1 mM

E. coli Poly(A)Polymerase 0,5 U/ μg RNA

Die Inkubation erfolgte für 5 min. bei 37°C .

Die optimalen Enzym- und Triphosphat-Konzentration, sowie die Inkubationszeit wurden erst in der vorliegenden Arbeit

ermittelt, was im Kapitel 3.2.1. näher erläutert wird.

Nach diesem und jedem weiteren, enzymatischen Schritt der cDNA-Synthese und der Klonierung wurde der Ansatz phenolisiert, gefällt und in H_2O aufgenommen, wenn nicht anders angegeben.

2.3.11.2. Messung der säurefällbaren Radioaktivität von Nukleinsäuren

Als Kriterium zur Messung der Einbaurate bei der cDNA-Synthese bzw. zur Bestimmung der spezifischen Aktivität markierter Nukleinsäuren bei Hybridisierungsexperimenten wurde die säurefällbare Radioaktivität herangezogen. Bei diesem Verfahren werden nur Nukleinsäuren gefällt, die größer als 20 Nukleotide sind, während kürzere Moleküle in Lösung bleiben und bei der nachfolgenden Filtration entfernt werden.

Ein Aliquot der zu messenden Probe wird mit kalter Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von mindestens 5% gemischt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf dem Nitrozellulose-Filter wird die TCA mit 1% Diphosphat versetzt. Als Fällhilfe wird ultraschall-behandelte Lachssperma-DNA in einer Endkonzentration von 4 mg/ml zugegeben. Nach 15 min. im Eisbad werden die Proben durch Nitrozellulose-Filter (Porengröße 0,6 μm) filtriert und mit 5%iger TCA mehrmals gewaschen. Die Filter werden dann bei 80°C getrocknet. Mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit pro Filter bestimmt man in einem Packard 3380 Beta-Zähler die "counts per minute" (cpm). Jede Probe wird zur Absicherung des Ergebnisses doppelt gezählt.

2.3.11.3. Syntheseberechnungen

Allen Einbauberechnungen wurde ein Molekulargewicht der 6/94-50S-RNA bzw. der 6/94-ss cDNA von 5×10^6 d (Kolakofsky et al. 1974) zu Grunde gelegt. Im Folgenden werden die zur Berechnung der einzelnen Syntheseraten zusätzlich benötigten Angaben zusammengestellt.

Polyadenylieren der 6/94-50S-RNA

Spezifische Aktivität ^3H -rATP: 23 Ci/mmol

1 uCi/43 pmol

1 uCi ^3H -rATP = 500000 cpm

Umrechnungsfaktor rATP/ ^3H -rATP = 84

Gleichung zur Berechnung der eingebauten Moleküle rAMP:

$X = \text{cpm}_{\text{gesamt}} \times \text{Umrechnungsfaktor} : 500000 \text{ cpmx}$
 $\times 43 \text{ pmol} \times 6 \times 10^{23} \text{ Moleküle/mol}$

10 ug 6/94-50S-RNA = 1,5 pmol = 9×10^{11} Moleküle

Moleküle rAMP/Molekül 6/94-50S-RNA =

eingebaute Moleküle rAMP/ 9×10^{11} Moleküle 6/94-50S-RNA

cDNA-Synthese

Spezifische Aktivität ^3H -dGTP: 16,2 Ci/mmol

1 uCi/61,7 pmol

Konzentration: 1 uCi ^3H -dGTP = 500000 cpm

Umrechnungsfaktor dGTP/ ^3H -dGTP = 12

(einschließlich Faktor 4

für alle vier eingebauten dNMPs)

Durchschnittliches Molekulargewicht

der dNMPs = 308,75 g/mol

Gleichung zur Berechnung der synthetisierten Menge

an ss cDNA:

$X = \text{cpm}_{\text{gesamt}} \times \text{Umrechnungsfaktor} : 500000 \text{ cpmx}$
 $\times 61,7 \text{ pmol} \times 308,75 \text{ pg/pmol}$

Gleichung zur Berechnung der eingebauten Moleküle dNMP:

$$X = \text{cpm}_{\text{gesamt}} \times \text{Umrechnungsfaktor} : 500000 \text{ cpm} \times \\ \times 61,7 \text{ pmol} \times 10^{23} \text{ Moleküle/mol}$$

C-Tailing des ss cDNA (Vorversuche mit ^3H -dCTP)

Spezifische Aktivität ^3H -dCTP: 16 Ci/mmol

1 uCi/62,5 pmol

1 uCi ^3H -dCTP = 500000 cpm

Umrechnungsfaktor dCTP/ ^3H -dCTP = 84

Die Berechnung der eingebauten Moleküle dCMP erfolgt
wie bei der Polyadenylierungs-Reaktion

ds cDNA-Synthese

Spezifische Aktivität ^{35}S -dATP: 884 Ci/mmol

1 uCi/1,2 pmol

1 uCi = 650000 cpm

Umrechnungsfaktor dATP/ ^{35}S -dATP = 324

Berechnung der synthetisierten Menge an ds cDNA erfolgt
nach derselben Gleichung wie bei der Synthese der ss cDNA.

2.3.11.4. Synthese einzelsträngiger cDNA

Es wurde in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.2.1.)
folgender Optimal-Ansatz zur Synthese einzelsträngiger (ss)
cDNA ermittelt:

Standard-Mix (10-fach) 1/10 Vol.

dATP 400 uM

dTTP 400 uM

dCTP 400 uM

dGTP 250 uM

^3H -dGTP 150 uM

(16,2 Ci/mmol)

(1 mCi/ml)

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 1 ug/ug Poly(A)-RNA

AMV Reverse Transkriptase 5 U/ug Poly(A)-RNA

Das Reaktionsvolumen betrug im Allgemeinen 100 μ l. Pro Ansatz wurden maximal 10 μ g Poly(A)-RNA eingesetzt. Die Reaktion fand bei einer Temperatur von 42°C in 40 min. statt.

2.3.11.5. C-Tailing der ss cDNA

Zur Strangtrennung wurden die RNA-cDNA-Hybride 5 min. bei 105°C hitzedenaturiert und sofort in flüssigem Stickstoff abgekühlt. An die ss cDNA wurde eine Poly(dC)-Kette unter folgenden Reaktionsbedingungen angehängt:

tdT-Puffer (10-fach)	1/10 Vol.
dCTP	100 μ M
terminale DNA-Transferase	7 u/ug cDNA
	(nach eigenen Ergebnissen
	-Kapitel 3.2.2.- optimierte Angabe)
ss cDNA	10 μ g/ml

Das Reaktionsvolumen betrug insgesamt 100 μ l. Inkubiert wurde 20 min. bei 15°C. Es sei darauf hingewiesen, daß CoCl_2 als letzte Komponente dem Ansatz zugefügt werden soll. Die Reaktion wurde bezüglich der Länge der Poly(dC)-Kette optimiert (Kapitel 3.2.2.). In diesen Vorversuchen mit Plasmid-DNA wurde, um den Einbau meßbar zu machen, ^3H -dCTP in einer Endkonzentration von 0,1 μ M zusätzlich im Reaktionsansatz eingesetzt.

2.3.11.6. Synthese des zweiten cDNA-Stranges

Der zweite, komplementäre cDNA-Strang wurde mit "Large Fragment" E. coli Polymerase I synthetisiert und dabei mit ^{35}S -dATP markiert. Als Primer wurde Oligo(dG)₁₂₋₁₈ verwendet. Im 100 μ l Ansatz wurden etwa 1 μ g ss Poly(dC)cDNA als Template eingesetzt:

Pol.I-Puffer (10-fach)	1/10 Vol.
Oligo(dG) ₁₂₋₁₈	1 ug/ug ss cDNA
dATP	100 uM
dTTP	100 uM
dCTP	100 uM
dGTP	100 uM
³⁵ S-dATP	1,25 uM
(864 Ci/mmol)	
(1,08 mCi/ml)	
ss Poly(dC)-cDNA	10 ug/ml
"Large Fragment" E. coli Polymerase I	25 u/ug ss cDNA

Die Synthese erfolgte bei 15°C und wurde nach 90 min. gestoppt. Die Messung der eingebauten ³⁵S-dAMP-Moleküle erfolgt im ¹⁴C-Kanal des Scintillationszählers. Zur Diskriminierung von der bereits bei der Synthese des ersten Stranges in die cDNA inkorporierten Radioaktivität wurde als Nullwert der Synthese ein Messwert vor Enzymzugabe eingesetzt.

2.3.11.7. Abbau einzelsträngiger Enden mit S1-Nuklease

Zum Abbau einzelsträngiger Endbereiche wurde die doppelsträngige (ds) cDNA mit S1-Nuklease verdaut. Die Reaktionsbedingungen sind bei Vogt (1980) beschrieben. Die Enzymkonzentration und die Inkubationszeit wurden in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.2.3.) speziell zur Erzeugung glatter Enden optimiert: Im S1-Puffer erfolgte eine Inkubation mit 0,1 u S1-Nuklease/ug ds cDNA für 10 min. bei 45°C.

2.3.12. Inkubation von DNA mit Restriktionsenzymen

In einem analytischen Ansatz von 20 ul werden zu 1 ug DNA 2 ul Inkubations-Puffer (10-fach), 2 ul BSA (100 mg/ml) (Nuklease-frei) und die vom Hersteller für eine vollständige Spaltung angegebene, notwendige Menge an Restriktionsenzym gegeben. Die Inkubation erfolgt 1-3 h bei 37°C. Eine

Ausnahme bildet das Restriktionsenzym *Taq* I, das bei 65°C optimal arbeitet. Wegen der hohen Temperatur kommt es leicht zum Verdunsten des H₂O und damit zu einer Konzentrierung der Komponenten im Ansatz. Es wurde deshalb dieser Reaktionsansatz mit Paraffinöl überschichtet.

2.3.13. DNA-Isolierung aus Phagen

1 ml einer frischen *E. coli* Übernachtskultur (etwa 1×10^9 Zellen/ml) wird mit 1 ml λ -Phagen (1×10^7 pfu) gemischt. Man läßt die Phagen 10 min. an die Zellen adsorbieren, wobei die Zugabe von 1% Maltose zum LB-Medium die Adsorption erleichtert und impft dann 1 l LB-Medium an. Nach etwa 7 h Schütteln bei 37°C werden 40 g NaCl und 2 ml Chloroform zugesetzt, nochmals 10 min. weitergeschüttelt und anschließend die nicht lysierten Bakterien abzentrifugiert. Mit 100 g PEG 6000 werden die Phagen bei 4°C über Nacht ausgefällt und anschließend bei 10000 rpm im GSA-Rotor der Sorvall-Zentrifuge (10 min.) pelletiert. Die Phagen werden in λ -Phagen-Puffer gelöst. Freie, zelluläre Nukleinsäuren werden mit 10 µg/ml RNase A bzw. DNase I (2 h, 37°C) verdaut. Bei 22000 rpm im SW 27-Rotor der Beckman-Zentrifuge (2 h, 10°C) werden die Phagen aus dem klaren Lysat pelletiert, aufgenommen und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Phagensuspension wird dann auf einen CsCl-Stufengradienten aus 1,7-, 1,5-, 1,45 g/ml CsCl in Phagen-Puffer geschichtet und zentrifugiert (SW 41-Rotor, 34000 rpm, 15°C, 2 h). Die λ -Phagen, die bei einer Dichte von 1,5 g/ml bandieren, werden seitlich mit einer Injektionskanüle abgezapft, mit gleichem Volumen CsCl-gesättigten Phagen-Puffer (Dichte 1,9 g/ml) gemischt, mit 1,65- und 1,45 g/ml CsCl-Lösung überschichtet und wie oben zentrifugiert. Die Phagenbande aus dem zweiten Gradienten wird gegen Phagen-Puffer dialysiert. Die Dialyse-Schläuche wurden in 2 mM EDTA 20 min. gekocht. Nach Zugabe von SDS auf 1% wird 2-mal phenolisiert. Die letzte, wässrige Phase wird gegen TE-Puffer über Nacht dialysiert. Zur weiteren Reinigung wird die DNA 2-mal mit Äthanol

ausgefällt und bei 4°C, in TE-Puffer gelöst, gelagert.

Die Schläuche zur Dialyse von Nukleinsäuren wurden einer besonderen Vorbehandlung unterzogen, die verhindert, daß Nukleinsäure an den Wänden der Dialyseschläuche gebunden wird, was zu einer Reduktion der DNA-Ausbeute führen würde. Man kocht die Schläuche 4-5 x 10 min. in 2% Na₂CO₃ x 10 H₂O, wäscht sie in H₂O und läßt sie 12 h in 2% Na₂CO₃ x 10 H₂O liegen. Dann werden sie in H₂O und anschließend 3-mal in 1 mM EDTA gekocht und wiederum mit H₂O gewaschen. Die Schläuche werden dann in 10 uM EDTA autoklaviert.

2.3.14. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wird im Spektralphotometer (Beckman) an seiner optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (O.D.₂₆₀) gemessen. Präparationen mit einem Extinktionsverhältnis 260:280 von annähernd 2:1 werden als rein bezeichnet, d.h. frei von Protein- und Phenolverunreinigungen. Die Mengenbestimmung erfolgt aus der Gleichung:

$$1 \text{ O.D.}_{260} = 50 \text{ ug DNA/ml}$$

$$1 \text{ O.D.}_{260} = 40 \text{ ug RNA/ml}$$

2.3.15. Präparation von Plasmid-DNA

In dieser Dissertation wurde hauptsächlich mit dem Plasmid pBR 327 gearbeitet, das in E. coli 490 repliziert wird. Das Plasmid trägt das Gen für Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz. Alle Kulturen mit pBR 327-haltigen Bakterien wurden deshalb unter selektiven Bedingungen, d.h. 100 ug/ml Ampicillin und 30 ug/ml Tetracyclin, gezogen.

Mit 10 ml einer frischen, Plasmid-haltigen E. coli Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und 5-7 h bis zur O.D.₆₀₀ = 1 bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mg/l Chloramphenicol wurden zur Amplifikation der Plasmid-DNA weitere 12-16 h geschüttelt. Die Bakteriensuspension wird

dann auf Eis abgekühlt und anschließend mit 5000 rpm im GSA-Rotor 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in 10 ml eiskalter Sucrose-Lösung (25% Sucrose/50 mM Tris-HCl pH 8,0) aufgenommen und mit 1,5 ml Lysozym-Lösung (5 mg/ml) in 200 mM Tris-HCl pH 8,0 5 min. bei 0-4°C inkubiert. Nach der Lyse der Zellen werden 4 ml 250 mM EDTA pH 8,0 zugesetzt und nach weiteren 5 min. 15 ml Triton-Mix zugegeben. Nach 10 min. auf Eis werden die Zelltrümmer abzentrifugiert und zum klaren Überstand 0,9 g CsCl/1 und 500 µg Ethidiumbromid/ml gegeben. Der Brechungsindex der Lösung wird mit CsCl auf 1,3974 +/- 0,0016 eingestellt. Nach Zentrifugation im SS 34-Rotor bei 16000 rpm 10°C befinden sich ein großer Teil der Proteine am oberen Röhrchenrand. Diese Proteinschicht wird abgenommen und im Ti 50-Rotor (16 h, 45000 rpm, 15°C) ein Dichtelauf durchgeführt, der chromosomale- und supercoiled Plasmid-DNA trennt. Durch seitliches Abzapfen mit einer Injektionskanüle wird die Plasmid-DNA isoliert. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, wird die DNA 4-mal mit Butanol ausgeschüttelt und dann 3-mal 1 h gegen TES dialysiert. Nach dem Phenolisieren mit 1% SDS fällt man die DNA 2-mal mit Äthanol aus und lagert sie in TE gelöst bei 4°C.

2.3.15.1. Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly 1979)

Bakterien werden in 5-10 ml Kulturen für mindestens 12 h bei 37°C geschüttelt und dann im Eisbad abgekühlt. Von jeder Kultur wird 1 ml in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 2 min). Die sedimentierten Bakterien werden bei 4°C in 100 µl einer frisch hergestellten Lysozymmischung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8) resuspendiert und 30 min stehengelassen. Es werden 200 µl alkalische SDS-Lösung (1% SDS; 0,2 M NaOH) und nach 5 min 170 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,8) zupipettiert und stark geschüttelt. Nach einer Stunde wird die Suspension zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 5 min). Der Überstand (400 µl) wird zweimal mit Ethanol

gefällt und in 40 µl TE-Puffer (Kapitel 2.3.4.) gelöst. 10 µl reichen für eine gelelektrophoretische Analyse aus.

2.3.16. Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente werden im Agarosegel präparativ aufgetrennt und die erhaltenen DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Agarosestückchen werden dann in einen Dialyseschlauch überführt. Man gibt ein möglichst kleines Volumen Elektrophorese-Puffer zu und eluiert die DNA elektrophoretisch. Um Agarosereste abzutrennen, die bei späteren enzymatischen Reaktionen stören würden, wird die DNA-Lösung nach einer Äthanol-Fällung in Elutip-Niedrigsalz-Puffer aufgenommen und über eine Elutio-Minisäule gereinigt (Young et al. 1979). Die gereinigte DNA, die dann in Elutip-Hochsalz-Puffer vorliegt, wird mit 2-fachem Volumen Äthanol gefällt. Neben der Reinigung kann über die Elutip-Minisäule auch eine starke Konzentrierung der DNA-Lösung erfolgen. Bei sehr kleinen Mengen wurde die DNA nach der Elution aus dem Gel nicht mit Äthanol gefällt, sondern in Niedrigsalz-Puffer stark verdünnt, direkt über die Säule gereinigt und auf 400 µl Volumen konzentriert. So lassen sich nach der Säule auch geringere Mengen an eluierter DNA mit Äthanol ausfällen.

2.3.17. Ligieren von DNA-Fragmenten An die glatten Enden der ds cDNA nach Nuklease S1-Verdau wurden Hind III-Linkermoleküle in folgendem Reaktionsansatz angehängt:

Ligase-Puffer (10-fach) 1/10 Vol.

ds cDNA 5 µg/ml

Hind III-Linker 100 µg/ml

ATP 1 mM

T4 DNA-Ligase 100 U/µg DNA

Die Konzentration an Ligase beträgt bei der Ligierung glatter Enden etwa das 10-fache wie bei der Verbindung überstehender Enden. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurde 50 ng ds cDNA eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen

erfolgten im Wesentlichen nach Dugaiczky et al. (1975). Nach Inkubation bei 22°C für 2 h wird die DNA mit Phenol extrahiert, mit Äthanol gefällt und in H₂O aufgenommen.

Bei der Ligierung überstehender Enden Hind III-geschnittener Vektor- und Insert-DNA wurde die Reaktionstemperatur auf 15°C herabgesetzt. Die Inkubation erfolgte 3-4 h in 1/10 Vol. Ligase-Puffer und bei einer Endkonzentration von 1 mM ATP. Die Konzentration an Ligase betrug hier 10 U/ug DNA. Die eingesetzten optimalen Konzentrationen an Vektor und Insert wurden in der vorliegenden Arbeit speziell ermittelt und sind im Kapitel 3.2.5. für einen Kontrollversuch mit den Klonierungsvektoren, in 3.2.7. für die Klonierung von 6/94-cDNA und in 3.4.1. für das Reklonieren der 6/94-cDNA in das Plasmid pBR 327 beschrieben.

2.3.18. Das lambda-Klonierungssystem

2.3.18.1. Vorbereiten der Klonierungsvektoren

Die Klonierungsvektoren 728 und 762 werden, wie im Kapitel 2.3.13. beschrieben, präpariert und von zellulärer DNA und Proteinen gereinigt. In einem präparativen Ansatz wird die DNA mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaut. Aus dem Vektor 762 wird das supF-Fragment durch Elektroelution von den beiden Vektorarmen getrennt. Die Hind III-verdauten Vektoren liegen zur Klonierung in TE-Puffer gelöst vor.

2.3.18.2. Präparation von Verpackungsextrakten

Aus den E. coli Stämmen BHB 2688 und BHB 2690 wurden Verpackungsextrakte nach der Methode von Hohn (1979) hergestellt. BHB 2688 und BHB 2690 enthalten lysogene lambda-Prophagen, die einen Defekt in verschiedenen Kopfgenen haben. BHB 2688 produziert ein nicht intaktes lambda-Kopfprotein E, BHB 2690 synthetisiert nicht funktionsfähiges Protein D. Bei der in vitro Verpackung komplementieren sich beide amber-Mutationen, was zu intakten

lambda-Phagen führt.

Frier-Tau-Lysat (FTL)

400 ml LB-Medium werden mit BHB 2688 1/100 angeimpft und bei 32°C bis zu einer O.D.₆₅₀ von 0,4 geschüttelt. Bei 45°C werden die lysogenen Phagen für 15 min. induziert und etwa 3 h weiter geschüttelt. Dann kühlt man die Zellsuspension in Eiswasser sehr schnell ab, um die Lyse der Zellen zu vermeiden. Im GSA-Rotor der Sorvall-Zentrifuge bei 6500 rpm 10 min. werden die Zellen pelletiert und in 0,5 ml eiskalter 10%iger Sucroslösung (in 0,05 M Tris-HCl pH 7,4) resuspendiert. Man portioniert zu jeweils 0,5 ml, gibt 1 mg Lysozym pro Röhrchen zu und friert sofort in N₂ fl ein. Nach dem Auftauen bei 4°C werden 125 µl FTL-Puffer zugegeben und bei 35000 rpm im Ti50-Rotor 25 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Potein-haltige Überstand wird in 50 µl Portionen in N₂ fl eingefroren und bei -80°C gelagert.

Ultraschallextrakt ("sonic extract" = SE)

E. coli BHB 2690-Zellen werden, wie für FTL beschrieben, induziert und sedimentiert, dann aber in 3 ml Puffer A aufgenommen und durch Ultraschall-Behandlung (pulsierend 15 min.) lysiert. Nach Abtrennen von Zelltrümmern wurde zum Überstand 0,6 ml FTL-Puffer gegeben, 25 µl Portionen in N₂ fl eingefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.3.18.3. In vitro Verpackung von DNA

Zur in vitro Verpackung wird die entsprechende DNA (50 ng 6/94 cDNA) in 2 µl H₂O aufgenommen und zuerst mit 2 µl SE vermischt. Nach Zugabe von 10 µl FTL wird 60 min. bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Verpackungsansatz wird anschließend in 300 µl lambda-Phagen-puffer verdünnt und mit 0,1 ml frischer Bakterien-Übernacht-kultur in 3 ml Weichagar auf LB-Platten titriert. Zur Adsorbtion läßt man die Phagen vor dem Ausplattieren etwa 10

min. bei 37°C an die Zellen adsorbieren. Sollen die Plaques für Filterhybridisierungs-Experimente auf Nitrozellulose übertragen werden, verwendet man statt Weichagar Weichagarose, um einen glatten Abdruck zu erhalten.

2.3.18.4. Plaque-Screening

Zur Untersuchung von Phagen auf spezifische DNA-Sequenzen wurde nach der Methode von Benton und Davis (1977) verfahren. Hierzu werden die Phagen auf Weichagarose-Platten über Nacht bei 37°C vermehrt. Die erhaltenen Plaques sollten dabei mit deutlichem Abstand voneinander vorliegen. Man stellt die Platten 30 min. in 4°C und legt dann 2 Nitrozellulosefilter luftblasenfrei übereinander auf eine Platte. Die Filter dürfen dann nicht mehr gegeneinander verschoben werden. Zur Markierung wird mit einer Nadel mehrmals durch Filter und Agarose gestochen. Der Transfer der Phagen findet 30 min. bei 4°C statt. Durch Behandlung mit NaOH werden die Phagenköpfe zerstört und die DNA denaturiert. Hierzu werden die Filter 5 min. in Lösung 1 gelegt und anschließend mindestens 5 min. mit den Lösungen 2 und 3 neutralisiert. Die DNA wird auf dem Filter 2 h bei 80°C eingebacken. Nach der Hybridisierung mit endmarkierter RNA (Kapitel 2.3.20.1. und 2.3.22.2.) werden nur diejenigen Plaques weiter untersucht, die ein positives Hybridisierungssignal sowohl auf dem ersten, als auch auf dem Duplikatfilter an derselben Stelle zeigen. Auf diese Weise können spezifische Hybridisierungssignale von "Background"-Signalen unterschieden werden.

2.3.19. Reklonieren von DNA in Plasmide

Unter den in Kapitel 2.3.17. beschriebenen Bedingungen für überstehende Enden werden die DNA-Fragmente mit dem Vektor pBR 327 ligiert, der mit dem Restriktionsenzym Hind III linearisiert worden war. Um DNA aufnehmen zu können, müssen die für die Transformation gewählten E. coli-Zellen zunächst kompetent gemacht werden.

100 ml LB-Medium wird 1/100 mit E. coli 490 angeimpft und bis zur logarithmischen Phase ($O.D._{650} = 0,6$) bei $37^{\circ}C$ gezogen. Man kühlt die Kultur sofort auf Eis ab und pelletiert die Zellen (4000 rpm, 5 min.). Die Zellen werden dann 2-mal mit kaltem 0,1 M $CaCl_2$ etwa 20 min. gewaschen und sind danach zur Transformation kompetent. Zum Aufbewahren bei $-20^{\circ}C$ fügt man den Zellen 50% Glycerin zu.

Zur Transformation werden 100 μ l kompetente Zellen mit 100 μ l TCM und 10-20 μ l DNA-Lösung (10-50 ng DNA) zuerst 30 min. bei $4^{\circ}C$, dann 4 min. bei $37^{\circ}C$ (Hitzeschock!) und 10 min. bei R.T. inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit 1 ml LB-Medium 1 h bei $37^{\circ}C$ geschüttelt und auf Agarplatten, die 50 μ g/ml Ampicillin enthalten, titriert. Die Insertion eines DNA-Fragments in die Hind III-Schnittstelle des Plasmids pBR 327 führt zum Verlust der Tetracyclin-Resistenz. Die nach Stempeln nur auf Ampicillin-, nicht aber auf Tetracyclin-Platten (15 μ g/ml) wachsenden Kolonien werden gepickt und in LB-Medium suspendiert. Pro μ g DNA wurden im Durchschnitt 10^4 Ampicillin-resistente Kolonien erhalten.

2.3.20. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

In Abhängigkeit von der Nukleinsäure wurden zur radioaktiven Markierung zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. RNA wurde am 5'-Ende mit ^{32}P -gamma-ATP, DNA dagegen durch Nick-Translation mit ^{32}P -alpha-dCTP markiert.

2.3.20.1. Endmarkierung von RNA

Um möglichst viele, markierungsfähige 5'-Enden zu erhalten, wurde die 6/94-50S-RNA zunächst alkalisch hydrolysiert. Diese Reaktion wurde in ungepufferter Tris-Lösung mit einem pH von 11,5 bei $90^{\circ}C$ 45 min. durchgeführt. Die Markierung erfolgte 30 min. bei $37^{\circ}C$ mit Polynukleotidkinase. Der Standardansatz enthielt:

Polynukleotidkinase-Puffer (10-fach) 1/10 Vol.

32 P-gamma-ATP 1,25 uM

(3000 Ci/mmol)

(10 mCi/ml)

Polynukleotidkinase 8 U/ug RNA

Die markierte RNA wurde durch eine Cethylmethylammonium-bromid-Fällung (CTAB) von nicht-eingebauten Nukleotiden gereinigt. Zum Standardansatz wird 1/5 Volumen 0,1 M CTAB und Lachssperma-DNA bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml gegeben. Nach 1 h bei 4°C wird die gefällte RNA abzentrifugiert (9800 g, 10 min.) und das Pellet in 100 ul 1 M NaCl-Lösung aufgenommen. In der anschließenden Äthanol-Fällung erfolgt eine weitere Reinigung der RNA von Salzen und Restnukleotiden.

Die Abtrennung der nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotide erfolgte in einigen Fällen auch durch Gelfiltration. Eine kleine Biogel-Säule (A 150 m), die als Molekularsieb wirkt, wird mit 400 ul TES-Puffer equilibriert und die RNA-Probe (100 ul) mit 10 Volumen des gleichen Puffers eluiert. Die 10 Fraktionen werden gesammelt und die "Cherenkow-counts" im Szintillationszähler (3 H-Kanal) bestimmt. Die markierte RNA wird nach der Größe aufgetrennt. Die letzten Fraktionen (4-10) enthalten die Restnukleotide. Die frühen Fraktionen (1-6) werden gepoolt und zur Nachreinigung noch 2-mal mit Äthanol gefällt.

Die spezifische Aktivität der 32 P-markierten RNA (cpm/ug) wurde bestimmt, indem ein Aliquot nach dem Entfernen der nicht-eingebauten Nukleotide mit TCA gefällt und im Szintillationszähler gemessen wurde (siehe Kapitel 2.3.11.2.).

2.3.20.2. Nick-Translation von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation folgt der Methode von Rigby et al. (1977). Es wurden dabei

DNA-Fragmente eingesetzt, die aus präparativen Agarosegelen elektroeluiert und gereinigt wurden (Kapitel 2.3.16.). Die Inkubation erfolgte bei 15°C in folgendem Standardansatz:

NT-Puffer (10-fach)	1/10 Vol.	
dATP	40	uM
dTTP	40	uM
dCTP	40	uM
dGTP	40	uM
DNA	2	ug/ml
³² P-alpha-dCTP	1	uM
	(3000 Ci/mmol)	
	(10 mCi/ml)	
DNase I	0,05	ug/ml
DNA-Polymerase I	250	u/ug DNA

Das Ansatzvolumen betrug im allgemeinen 50 ul. Die spezifische Aktivität der ³²P-markierten DNA wurde durch Fällung eines Aliquots mit TCA bestimmt. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide bleiben in Lösung und beeinträchtigen die Messung im Szintillationszähler nicht. Der Einbau von ³²P-dCMP wurde kinetisch verfolgt. Ein Optimum ergab sich stets zwischen 60 und 90 min. Inkubationszeit. Es wurden spezifische Aktivitäten bis zu maximal 2×10^9 cpm/ug DNA erhalten. Die nick-translatierte DNA wurde wie die endmarkierte RNA durch CTAB- und Äthanol-Fällung gereinigt, in TE-Puffer gelöst und bei -20°C eingefroren bis zum Einsatz im Hybridisierungsexperiment gelagert. Wurde ³²P-nicktranslatierte DNA der Klone E, W oder C als Hybridisierungsprobe eingesetzt, so handelte es sich dabei stets um das eluierte 6/94-cDNA-Insert, das nach Restriktion der Klon-DNA mit Hind III in einem präparativen Agarosegel von den Vektorarmen getrennt worden war.

2.3.21. Blotten von Nukleinsäuren auf Filtermembranen

Für Hybridisierungsexperimente wurde DNA auf herkömmliche Nitrozellulose-Filter, RNA auf spezielle "Gene screen plus"-Nitrozellulose-Membranen transferiert.

2.3.21.1. Dot Blot

Im Dot Blot wird die DNA, wenn nicht anders angegeben, zunächst durch Hitze (5 min., 105°C), RNA mit Glyoxal (Kapitel 2.3.10.2.1.) denaturiert und auf die entsprechende Filtermembran aufgebracht, die zuvor 10 min. in 2 x SSC getränkt und unter einer Lampe getrocknet worden war. Die Nukleinsäuren werden mittels einer speziellen Absaugapparatur auf einen kleinen Fleck von etwa 3 mm Durchmesser konzentriert. Es läßt sich somit die Stärke eines Hybridisierungssignals verschiedener Proben in einem Experiment vergleichen. Die Nitrozellulose-Filter werden nach dem Nukleinsäure-Transfer zuerst bei Raumtemperatur getrocknet, und dann im Vakuum-Ofen bei 80°C 2 h gebacken.

2.3.21.2. Southern Blot

Diese Methode (Southern 1975) erlaubt eine Übertragung der in Agarosegelen aufgetrennten DNA auf Nitrozellulose-Filter. Man markiert durch Einstiche mit einer Pasteurpipette unter UV-Licht die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden des Längenstandards. Dann bereitet man die DNA für den Transfer vor, indem man sie zunächst im Gel 2 x 15 min. mit Säure behandelt (Lösung 1), dann 45 min. mit NaOH denaturiert (Lösung 2) und schließlich mindestens 45 min. neutralisiert (Lösung 3). Das Gel wird danach für 15 min. in die Transferlösung (20 x SSC) gelegt. Die DNA wird durch Diffusion auf Nitrozellulose übertragen. Durch mehrfaches Wechseln des Ansaugpapiers wird die Diffusion erleichtert. Nach 12-16 h Transfer werden durch kurzes Abspritzen mit H_2O Agarosereste vom Filter entfernt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wird der Filter wie beim Dot Blot gebacken.

Die Vollständigkeit des Transfers wird durch Nachfärben des Gels nach dem blot überprüft.

2.3.21.3. Northern Blot

RNA wurde aus einem Glyoxalgel auf die spezielle Transfer-Membran "Gene screen plus" übertragen, welche besonders gute Bindungseigenschaften für RNA besitzt. Es wurde nach dem vom Hersteller (NEN) beschriebenen Verfahren vorgegangen. Die Effizienz der Übertragung vorallem hochmolekularer RNA ist im Elektroblot höher, als im Diffusionsblot.

Der Filter wird zunächst 15 min. in TNE gewaschen und dann so auf das Gel gelegt, daß die Seite B des Filters mit dem Gel im Kontakt kommt. Luftblasen werden entfernt. Man bringt Gel und Filter in eine spezielle Elektroblot-Apparatur mit etwa 4 l TNE-Puffer und startet den Elektrotransfer mit 10V. Nach 1 h erhöht man die Spannung auf 40V. Der komplette Transfer der RNA-Moleküle soll dabei in 2 h abgeschlossen sein. Während des Elektrotransfers wird der Puffer mit einem Magnetrührer gemischt und außerdem durch Wasserkühlung mit Kühlschlangen im Kältelabor (4°C) auf einer Temperatur von 5-20°C gehalten. Anschließend wird die RNA auf dem Filter in 50 mM NaOH 30 sek. denaturiert und in TSN für 30 sek. neutralisiert. Der Northern Blot wird nicht gebacken, man läßt ihn nur bei Raumtemperatur trocknen.

2.3.22. Hybridisierungen

Die auf Filtermembranen übertragenen Nukleinsäuren werden mit ^{32}P -markierten, spezifischen Nukleinsäure-Proben hybridisiert, um ihre Basenkomplementarität festzustellen. Es können DNA-DNA- und RNA-DNA-Bindungen eingegangen werden, welche aber unterschiedllche Reaktionsbedingungen bevorzugen.

2.3.22.1. DNA-DNA-Bindungen

DNA-DNA-Bindungen erfolgten im Wesentlichen nach der Methode von Southern (1975). Die Filter werden zur Prähybridisierung in Plastiktüten mit 5-10 ml Southern-Hybridisierungslösung möglichst luftblasenfrei eingeschweißt. Die enthaltene Lachssperma-DNA wurde vorher durch Ultraschallbehandlung auf eine durchschnittliche Länge von etwa 200 Nukleotiden reduziert und hitzedenaturiert (10 min., 100°C). Nach Inkubation für 1 h bei 68°C wird die Hybridisierungslösung durch neue ersetzt, die zusätzlich die hitzedenaturierte, ³²P-nick-translatierte DNA-Probe enthielt. Die spezifische Aktivität der eingesetzten Hybridisierungsproben lag zwischen 5-10 x 10⁸ cpm/ug DNA. Nach Hybridisierung von 36-48 h werden die Filter gewaschen, um die ungebundene Radioaktivität zu entfernen: 2-3-mal 5 min. in Waschlösung 1 bei Raumtemperatur, dann 2-3-mal 20-30 min. in Waschlösung 2 bei 60°C. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur erfolgte die Autoradiographie mit unterschiedlichen Expositionszeiten bei -80°C.

2.3.22.2. RNA-DNA-Bindungen

Die bevorzugte Methode der Hybridisierung von RNA auf Filtermembranen mit ³²P-markierter DNA stammt von Thomas (1980), wurde aber nach dem Protokoll der Firma NEN ("Gene Screen Plus - Hybridisation Transfer Membran") abgeändert.

Der Filter (14 x 14 cm) wird in 10 ml Formamid-Hybridisierungs-Lösung mindestens 6 h unter ständiger Bewegung prähybridisiert. Durch Verwendung von 50% Formamid, das sorgfältig über "Mixed Bed Resin" deionisiert werden muß, erniedrigt sich die benötigte Hybridisierungstemperatur auf 42°C. Zur Hybridisierung fügt man Lachssperma-DNA (mindestens 100 ug/ml) und radioaktive Probe hinzu, die zusammen denaturiert wurden. Um ein optimales Signal gegenüber dem Background zu bekommen, wurden in der Endkonzentration nur etwa 10 ng/ml nick-translatierte DNA

(circa 5×10^6 cpm) eingesetzt und bei 42°C 6-24 h unter ständigem, leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Hybridisierung wird der Filter zuerst bei Raumtemperatur 5 min. in $2 \times \text{SSC}$, dann bei 60°C 30 min. in $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS und zuletzt bei Raumtemperatur 30 min. in $0,1 \times \text{SSC}$ auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wird der Röntgenfilm aufgelegt und wie üblich exponiert und entwickelt.

2.3.23. Sicherheitsmaßnahmen

Alle Experimente mit intakten Viruspartikeln bzw. virusinfizierten Zellkulturen fanden in einem speziellen Viruslabor unter einer "class II laminar flow" Werkbank (Stolco) statt. In der Werkbank erfolgte direkt eine Desinfektion aller Gefäße mit einer 2%igen Lorasol-V-Lösung. Alle benutzten Glaswaren und Geräte wurden zusammen mit dem im Labor anfallenden Abfall autoklaviert. Nur gereinigte virale Nukleinsäuren und Proteine dürfen außerhalb dieses Sicherheitsbereichs in biochemischen Labors weiterverarbeitet werden. Im Viruslabor werden Schutzkittel und Einmalhandschuhe getragen.

Die Klonierung und die Vermehrung rekombinanter Phagen und Bakterien wurden unter L3B1 Sicherheitsbedingungen durchgeführt, wie sie von der Deutschen Zentralen Kommission für biologische Sicherheit vorgeschrieben werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorüberlegungen und Vorarbeiten zur Klonierung genomischer 6/94-RNA

Die Klonierung von Paramyxovirus-RNA war zu Beginn der vorliegenden Dissertation nur in einer einzigen Arbeit beschrieben worden. Es handelt sich dabei um cDNA-Klone von Masernvirus-mRNA, deren Länge maximal 600 Nukleotide erreichte, also nur etwa 1/20 der vollen Genomlänge (Gorecki und Rozenblatt 1980; Rozenblatt et al. 1982). Im Hybridisierungsexperiment zum Nachweis viraler Nukleinsäure in infizierten Zellen sollten aber möglichst große Teile des viralen Genoms repräsentiert sein. Außerdem lassen sich Untersuchungen zur Genomorganisation nur an genomischen cDNA-Kopien durchführen. Die Analyse klonierter, viraler mRNA kann nicht zum Ziel führen.

Aus diesen Gründen bemühten sich schon seit längerer Zeit mehrere Arbeitsgruppen um die Klonierung möglichst langer cDNA-Transkripte genomischer RNA von Paramyxoviren.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Synthese und Klonierung genomischer cDNA des Paramyxovirus 6/94. Dabei waren mehrere Schwierigkeiten zu überwinden:

1. Ist das 3'-Ende eines viralen Genoms bekannt, besteht die Möglichkeit, bei der Synthese viraler cDNA direkt einen synthetischen Primer zu verwenden. Da man zur Zeit der Klonierungsexperimente von 6/94-cDNA das 3'-Ende von Sendai- bzw. 6/94-RNA noch nicht kannte, war dieser Weg ausgeschlossen.

2. Bei früheren Arbeiten (Neubert 1976, 1979) wurde mit Oligo(dG) als Primer cDNA synthetisiert. Aber Oligo(dG) findet, im Gegensatz zu Oligo(dT), offensichtlich viele komplementäre Sequenzen im 6/94-Genom, an denen die Reverse Transkription starten kann. Dieses "Zufalls-Priming" behindert die Synthese durchgehender, längerer Transkripte und führt deshalb nur zu Syntheseprodukten mit einer

Maximallänge von 2000 Nukleotiden. Deshalb erschien diese Methode ungeeignet.

3. 6/94 enthält, wie alle Para- und auch Orthomyxoviren, Negativ-Strang-RNA. Das virale Genom besitzt also kein Poly(A)-Ende, das sich als Startsignal der Reversen Transkription mit Oligo(dT) als Primer eignen könnte. Durch Polyadenylierung des 3'-Endes der genomischen RNA kann aber diese Situation geschaffen werden. Da durch Degradation der RNA normalerweise keine freien 3'-OH-Enden entstehen, die dann ebenfalls mit Poly(A) verlängert würden und mit Oligo(dT) zur Synthese von cDNA-Kopien führen könnten. kann zunächst davon ausgegangen werden, daß die cDNA-Synthese einheitlich am polyadenylierten 3'-Ende des Genoms beginnt.

4. Eine weitere Schwierigkeit ist durch die Länge der genomischen RNA mit ca. 15 kb bedingt (Kolakofsky et al. 1974). Es wurde bisher noch nie beschrieben, daß cDNA-Kopien solcher Größe erhalten werden können. Bei Influenzaviren, die ein segmentiertes RNA-Genom besitzen, konnten die einzelnen Fragmente zwar vollständig als cDNA kloniert werden. Diese Fragmente sind aber höchstens 1,95 kb (Lai et al. 1980) lang.

5. Es war außerdem zu erwarten, daß die Länge der Syntheseprodukte im Allgemeinen sehr unterschiedlich ist (Efstratiadis et al. 1976). Wegen der Heterogenität ist die synthetisierte cDNA zu einer direkten Restriktions- oder gar Sequenzanalyse nicht geeignet, was die Notwendigkeit des Klonierens weiter unterstreicht.

6. Zur Klonierung von Paramyxovirus-RNA benötigt man hochgereinigte, nicht degradierte RNA voller Genomlänge. Daß allein die Isolierung solcher hochmolekularer RNA ein Problem darstellt, wurde von Bazcko et al. (1983) ausführlich beschrieben.

7. Hinzu kommt, daß aus eigenen Vorversuchen zu erwarten war, daß die Transkriptionseffizienz nur ca. 10% beträgt. Zum Einsatz im Klonierungsexperiment und auch zur Infektion von Versuchstieren muß zunächst eine ausreichende Menge an 6/94 ST-Virus für die Isolierung viraler RNA erhalten werden. Gerade die Optimierung von Versuchsansätzen im

Bereich der cDNA-Synthese erfordert mehr virale RNA, als im eigentlichen Klonierungsansatz nötig ist. Zur Klonierung wurde in der vorliegenden Arbeit der Virustyp 6/94 ST verwendet, da dieser im Gegensatz zu den anderen 6/94-Virusvarianten in bebrüteten Hühnereiern züchtbar ist. Das 6/94 ST-Virus erreicht im Hühnerei um ungefähr 1000 mal höhere Virustiter als in Zellkultur und ermöglicht dadurch auch größere RNA-Ausbeuten.

3.1.1. Züchtung von 6/94-Viren im Hühnerei

Das 6/94 ST-Virus wird in der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier vermehrt und in die Allantoisflüssigkeit abgegeben, die dann auf ihren Gehalt an Viruspartikeln und auf ihre Infektiosität untersucht wird. Dabei dient der Hämagglutinationstest der quantitativen Bestimmung von hämagglutinierenden Einheiten. Die in den beschriebenen Experimenten verwendete Virussuspension enthielt im Durchschnitt 2000 bis 3000 hämagglutinierende Einheiten pro ml (HA/ml), was einer Anzahl von 2 bis 3×10^{10} Viruspartikeln pro ml entspricht. Die Infektiosität des Virusmaterials wurde im Kulturinfektionsdosistest (KID-Test) zu 40.000 bis 80.000 Kulturinfektionsdosen pro ml (KID/ml) ermittelt. Die durchschnittliche Ausbeute an 6/94-Virus aus 100 bebrüteten Hühnereiern betrug damit bei etwa 1 l Allantoisflüssigkeit insgesamt 2 bis 3×10^6 HA und 4×10^7 KID. Die 6/94-Virusausbeute konnte gegenüber früheren Jahren wesentlich gesteigert werden, was wahrscheinlich einer steigenden Adaptierung des Virus an die Chorioallantoismembran-Zellen zuzuschreiben ist.

3.1.2. Isolierung der genomischen RNA des 6/94-Virus

Die virushaltige Allantoisflüssigkeit enthält neben den 6/94-Viren eine Vielzahl von zellulären Komponenten, die vor der Isolierung viraler RNA abgetrennt werden müssen. Zelluläre und virale Nukleinsäuren würden im Klonierungsexperiment konkurrieren. Deshalb müssen die Viruspartikel in

mehreren Zentrifugationsschritten gereinigt werden. Danach werden durch Behandlung mit SDS und Phenol Proteine von Nukleinsäuren getrennt. Da die Präparation von intakter, undegradierter RNA Voraussetzung für das Gelingen der folgenden Experimente ist, muß auf absolute Sterilität geachtet werden. Außer SDS, das sich leicht wieder entfernen läßt, wurde kein RNase-Hemmer zugesetzt, da eventuell verbleibende Restaktivitäten die folgenden enzymatischen Reaktionen stören könnten. Um eine zusätzliche Reinigung zu erreichen, wurde vor dem Sedimentationsgradienten die RNA, welche größer als 10S ist, durch Salzfällung abgetrennt. Dabei bleiben nicht nur Teile niedermolekularer RNA, sondern auch eventuelle Kontaminationen mit zellulärer DNA weitgehend in Lösung (Kirby et al. 1968). Die erhaltene RNA wurde dann im Sucrose-Sedimentationsgradienten analysiert. Abbildung 1 zeigt die charakteristische Verteilung bei der Sedimentationsgradienten-Analyse von 6/94-RNA. Bei einer Wellenlänge von 260 nm gibt das Spektrum die Trennung der RNA-Species mit unterschiedlichen S-Werten wieder: Die genomische RNA des Virus mit 50S und die RNA defektiver Partikel zwischen 4 und 28S (Amesse et al. 1982). Im Bereich der niedermolekularen RNA defektiver Partikel bandieren auch die ribosomale RNA von 28 und 18S, die beim "Budding" der 6/94-Partikel mit in die Virushülle eingeschlossen werden (Amesse et al. 1982). Deshalb wurde im Klonierungsexperiment nur 50S-RNA verwendet, die über einen Sedimentationsgradienten abgetrennt worden war. Den Erfolg der Reinigung zeigt Abbildung 2. 6/94-Gesamt-RNA aus gereinigten Viruspartikeln enthält neben der viralen 50S-RNA einen überwiegenden Anteil an niedermolekularer, sehr heterogener Nukleinsäure (Spur 3). Die Spur 4 zeigt genomische 6/94-50S-RNA, die aus dem Sucrose-Sedimentationsgradienten isoliert wurde. Ein Vergleich der beiden Spuren macht deutlich, daß die Abtrennung der hochmolekularen RNA im Gradienten sehr effizient erfolgt. Um auszuschließen, daß die hochmolekulare Nukleinsäure (Spur 4), eine Kontamination mit zellulärer DNA darstellt, die im Verlauf der Reinigungsprozedur mitgeschleppt worden war, wurde die Probe mit RNase

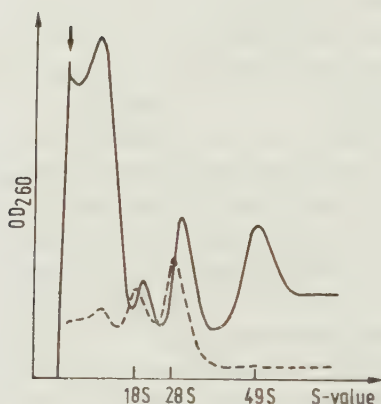


Abb. 1:

Analyse von 6/94 ST-Gesamt-RNA aus gereinigten Viruspartikeln durch Geschwindigkeitszentrifugation.

Nach Phenol-Extraktion wurde die virale RNA von im Hühnerei vermehrten 6/94-Viren in einem kontinuierlichen 5-20% Sucrose-Gradienten in STE-Puffer mit 0,1% SDS analysiert. In einem Parallel-Gradienten wurde unter identischen Bedingungen ribosomale RNA aus BSC-1-Zellen mit 28 und 18S als Marker verwendet. Die Zentrifugation erfolgte im SW 56-Rotor bei 45 000 rpm und 17°C für 80 min.

————— 6/94 ST-RNA

- - - - ribosomale RNA

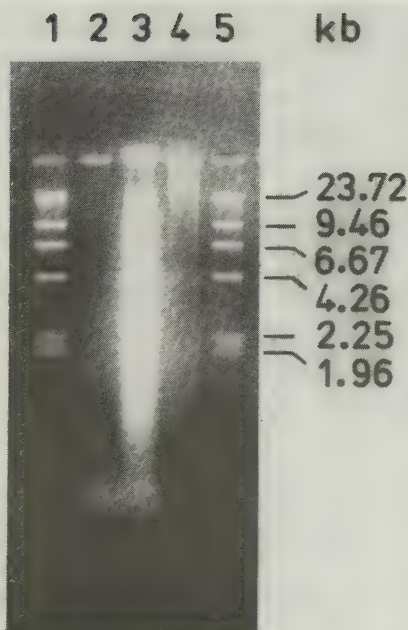


Abb. 2:

Analyse der im Sedimentationsgradienten abgetrennten
6/94 ST-50S-RNA.

Hochmolekulare 6/94 ST-50S-RNA, die durch Geschwindigkeits-
zentrifugation von niedermolekularer RNA getrennt worden
war, wurde in einem 0,8% Agarosegel analysiert.

Spur 1 und 5: 2 ug mit Hind III verdaute lambda-DNA
als Längenstandard.

Spur 2: 4 ug 6/94 ST-50S-RNA nach Inkubation mit
0,2 ug RNase A bei 37°C für 30 min.

Spur 3: 20 ug 6/94 ST-Gesamt-RNA.

Spur 4: 4 ug 6/94 ST-50S-RNA.

behandelt. Wie in Spur 2 ersichtlich, wurde dadurch die isolierte hochmolekulare Nukleinsäure hydrolysiert. Die eventuell in der Enzymcharge als Verunreinigung vorhandene DNase wurde durch Präinkubation des Enzyms für 10 min. bei 80°C inaktiviert. Diese Behandlung beeinträchtigt die Funktion der RNase nicht. Die hochmolekulare Bande (Spur 4) ist damit eindeutig als RNA charakterisiert.

Auf das Ausgangsmaterial von 100 infizierten Hühnereiern bezogen, wurde insgesamt ca. 50 µg RNA erhalten, davon ca 10 µg hochmolekulare, virale RNA mit voller Genomlänge. Der Anteil an viraler 50S-RNA beträgt also ca 20%.

3.2. Klonierung genomischer cDNA-Fragmente des 6/94-Virus

Als Ausgangsmaterial im Klonierungsexperiment wurde gereinigte 6/94-50S-RNA eingesetzt. Abbildung 3 zeigt schematisch die Strategie, die zur Klonierung der 6/94-50S-RNA entwickelt wurde. Die aufeinanderfolgenden Schritte werden im Folgenden einzeln erläutert.

3.2.1. Synthese der ss cDNA

Die 6/94-50S-RNA wurde zunächst am 3'-Ende polyadenyliert, um später mit Oligo(dT) als Primer die cDNA-Synthese starten zu können. Das RNA-spezifische Enzym RNA-Adenyltransferase verlängert das freie 3'-OH-Ende des Nukleinsäuremoleküls mit einer Poly(A)-Kette (Sippel et al. 1973). Das Enzym synthetisiert bevorzugt sehr lange Poly(A)-Ketten, wobei Längen bis zu mehreren tausend Basen schnell erreicht werden (Sippel et al. 1973). Um den homopolymeren Bereich der RNA nicht zu lang werden zu lassen, ist es wichtig, die Länge der synthetisierten Poly(A)-Kette zu limitieren.

Im Standard-Ansatz (Sippel et al. 1973) wurden drei Faktoren variiert: die eingesetzte RNA-Menge, die Enzymeinheiten und die Inkubationszeit. Die quantitative Bestimmung der Synthese erfolgte mit ³H-markiertem

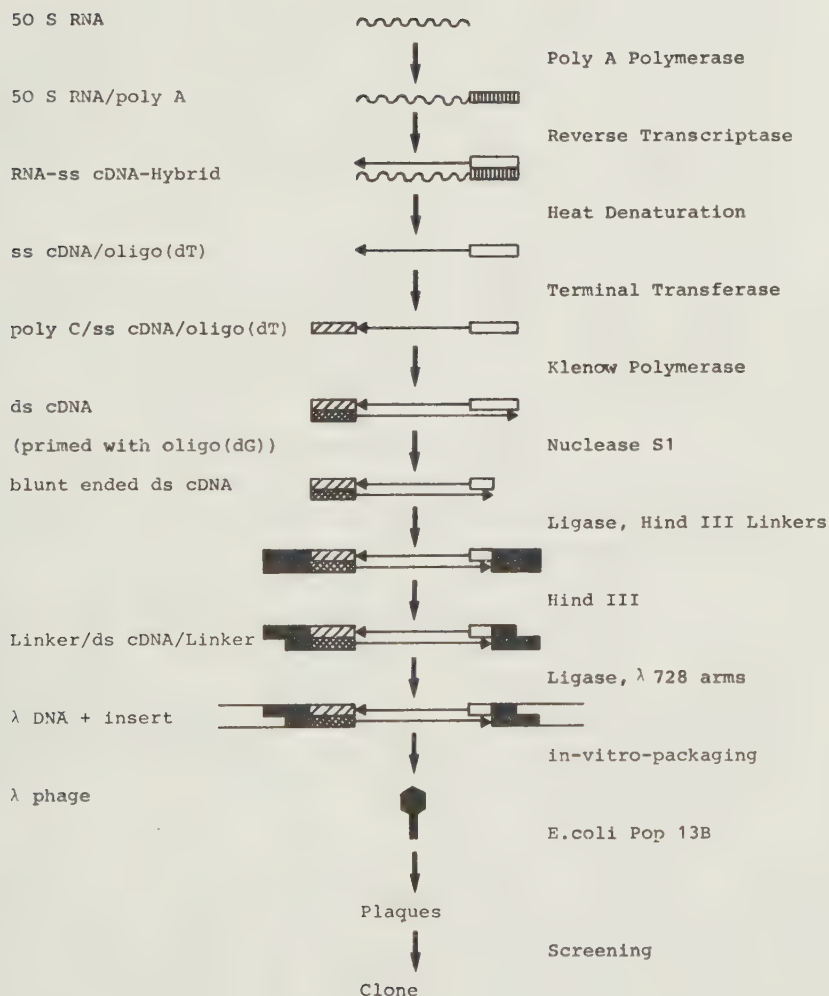


Abb. 3:

Klonierungsstrategie für genomische 6/94-RNA.

Die Abbildung 3 zeigt die Strategie, die gewählt wurde, um genomische 6/94 ST-50S-RNA in Form von cDNA unter Verwendung von lambda-Vektoren zu klonieren. Die einzelnen Schritte werden im Kapitel 3.2. ausführlich erläutert.

Adenosintriphosphat. Die Reaktion an 6/94-RNA verlief optimal bei 5 min, 37°C, 10 µg 6/94-50S-RNA und 5 Einheiten RNA-Adenyltransferase. Die eingebauten radioaktiven Nukleotide werden, wie im Kapitel 2.3.11.2. angegeben, gemessen. Daraus läßt sich der Optimalansatz berechnen (siehe Kapitel 2.3.11.3.), bei dem an ein Molekül 50S-RNA 30 bis 50 Moleküle AMP angehängt werden (Tabelle 3).

Die Grundlagen zu den Messungen und Berechnungen in allen folgenden Schritten der cDNA-Synthese sind im Methodenteil angegeben (Kapitel 2.3.11.2. und 2.3.11.3.) und in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die aufgeführten Werte sind stets Durchschnittswerte aus mehreren experimentellen Ansätzen.

Die polyadenylierte 50S-RNA wurde als Template zur Synthese von ss cDNA-Kopien eingesetzt. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer DNA- und RNA-abhängigen DNA-Polymerase des "avian myeloblastosis virus" (AMV), und mit Oligo(dT) als Primer wurden in vitro cDNA-Kopien synthetisiert. Die Synthesebedingungen für 6/94-cDNA waren bereits im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit grundlegend erarbeitet worden, (Neubert 1976; Neubert 1979; Neubert et al. 1983), jedoch wurde dabei eine Produktlänge von 12S nicht überschritten. Deshalb wurden diese Bedingungen in der vorliegenden Arbeit noch weiter optimiert.

Die Produktlänge wird vor allem von der dNTP-Konzentration beeinflusst. Die von Retzel (1980) ermittelte Optimalkonzentration von 75 µM erbringt cDNA-Transkripte bis ca. 2000 Nukleotide. Am natürlichen Template des Enzyms, der AMV-RNA ergibt sich als Optimum 75 µM. Unter einer Konzentration von 50 µM dNTP werden signifikant weniger Kopien voller Templatelänge synthetisiert (Efstratiades et al. 1976). Maniatis und Mitarbeiter (1982) geben an, daß generell Konzentrationen von 200-250 µM dNTP gewählt werden. Unter Berücksichtigung der überlangen 6/94-RNA wurden noch höhere dNTP-Konzentrationen im Ansatz erprobt. Es konnte festgestellt werden, daß die Länge der synthetisierten

Tabelle 3:
Einbaureagenzien der 6/94-cDNA-Synthese

Zur Reaktion eingesetzte Menge	Polyadenylieren der 6/94 ST-50S-RNA	Synthese der ss 6/94-cDNA	Synthese der ds 6/94-cDNA
	10 ug 50S-RNA	10 ug 50S-RNA Poly(A)	1 ug ss cDNA
Verwendetes, radioaktives Nukleotid	^3H -rATP	^3H -dGTP	^{35}S -dATP
Gesamt-cpm-Zunahme in 100 ul Ansatz	8000	$2,3 \times 10^6$	4×10^5
Messung im	^3H -Kanal	^3H -Kanal	^{14}C -Kanal
Umrechnungsfaktor *	84	12	81
Eingebaute pMol	56	3470	240
Eingebaute Moleküle rNMP bzw. dNMP **	38	2300	0,1
Synthese-Effizienz ***	-	10%	7%
Ausbeute in % ****	100	10	1,5 vor S1 1,2 nach S1
Ausbeute in ug	10	1	0,12 nach S1

* ermittelt aus dem molaren Verhältnis von markierten und nicht-markierten Nukleotiden im Ansatz
 ** pro Molekül RNA-Template
 *** Moleküle pro Molekül Synthesesubstrat
 **** bezogen auf 10 ug 6/94-50S-RNA

6/94-cDNA deutlich von der Konzentration der Deoxynukleosid-triphosphate (dNTP) abhängt.

Mit dem für 6/94 ermittelten Optimum von 400 μ M dNTP wurden cDNA-Kopien bis zu voller Genomlänge erzielt, wie noch im Kapitel 3.2.3. genauer ausgeführt werden wird. Das ermittelte Optimum für die Synthese am 6/94-Substrat liegt mit jeweils 400 μ M dNTP um den Faktor 5 höher als von Retzel et al. (1980) für andere RNA-Templates beschrieben wurde.

Eine Steigerung der Enzymkonzentration auf 80 Einheiten Reverser Transkriptase pro μ g RNA soll ebenfalls zu einer Kopienverlängerung führen (Friedmann und Rosbach 1977). Da aber bekannt ist, daß mit RNase-Kontaminationen in allen Enzymchargen der Reversen Transkriptase (sowohl von der Firma Beard als auch von Boehringer) zu rechnen ist (Myers et al. 1980; Maniatis et al. 1982), wurde auf eine Erhöhung der Enzymkonzentration verzichtet und die im Vergleich zu früheren Arbeiten (Neubert 1979) niedrige Enzymkonzentration von 5 Einheiten pro μ g RNA gewählt.

Eine quantitative Bestimmung der synthetisierten cDNA-Menge erfolgt aus der Berechnung der Einbaurrate an ^3H -dGMP. Die Transkriptionseffizienz erreicht bis zu 10%, d.h. bezogen auf eingesetzte 10 μ g 50S RNA wird 1 μ g ss cDNA synthetisiert (Tabelle 3).

3.2.2. Synthese der ds cDNA

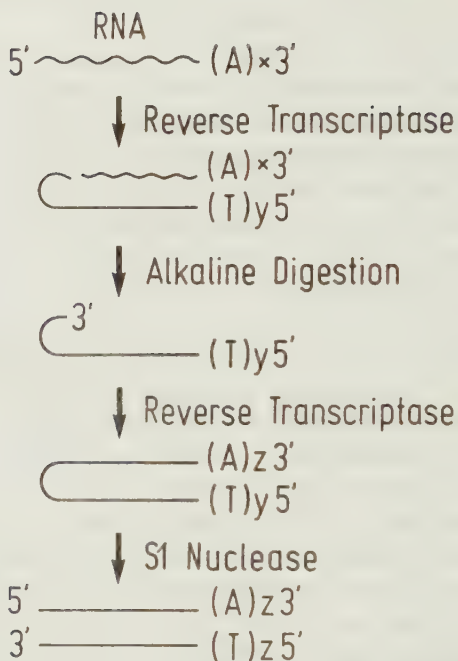
Die Reverse Transkriptase kann sowohl an einer RNA als auch an einer DNA als Template die entsprechende cDNA synthetisieren. Bei der Klonierung von Poliovirus-RNA (Nomoto et al. 1982), Masernvirus-RNA (Gorecki und Rozenblatt 1980) und inzwischen auch Sendaivirus-RNA (Shioda et al. 1983; Gupta et al. 1983) konnte allein mit Reverser Transkriptase ds cDNA erhalten werden. Aus bisher nicht verstandenen Gründen wird vom Enzym am 3'-Ende der ss cDNA eine "Haarnadel"-Struktur geformt, die als Primer die

Synthese des zweiten DNA-Stranges ermöglicht (Maniatis et al. 1982). Diese Eigenheit sollte auch für die Klonierung der 6/94-RNA ausgenutzt werden.

Nach alkalischer Hydrolyse des RNA-DNA-Hybrids in 0,2 M KOH (12 h, 25°C) sollte die RNA denaturiert und die cDNA damit von der Template-RNA befreit sein. Dann sollte am ss cDNA-Molekül die Synthese des Doppelstrangs mit Reverser Transkriptase ungehindert ablaufen können, wenn als Primer die vom Enzym gebildete "Haarnadel"-Struktur fungiert (Abb. 4; Ullrich et al. 1977).

Die erste Schwierigkeit ergab sich beim alkalischen Verdau. Es war zunächst nicht erklärbar, warum in Versuchsreihen bis zu 80% der synthetisierten cDNA verdaut wurde. Erkundigungen bei verschiedenen Firmen ergaben, daß die zugesetzten, unmarkierten dNTP je nach Lieferung unterschiedlich große Verunreinigungen an rNTP enthalten können. Diese Kontamination wird auf Werte bis zu 1% rNTP-Gehalt geschätzt. Folglich wird die synthetisierte cDNA an allen Stellen, an denen Ribo- statt Deoxyribonukleotid-monophosphate eingebaut wurden, alkalisch hydrolysiert. Um eine Degradation der cDNA durch diesen Effekt zu vermeiden, wurden die cDNA-RNA-Stränge nun durch Erhitzen getrennt. Die abgetrennte virale RNA wurde im Ansatz belassen, da sie die Äthanol-fällung der relativ kleinen Menge an synthetisierter cDNA erleichtert. Es mußte somit keine weitere Nukleinsäure als Carrier zugesetzt werden, die bei der Klonierung nur eine Kontamination darstellen würde und damit die vorhergehende intensive Reinigung der viralen RNA wieder zunichte gemacht hätte.

Um auch geringe Syntheseraten des zweiten DNA-Stranges messen zu können, wurde eine andere radioaktive Markierung verwendet. Die Messung von eingebauten ^{35}S -dAMP erlaubt eine deutliche Unterscheidung der Doppelstrangsynthese vom ^3H -markierten ersten Strang.



(nach Ulrich et al., 1977)

Abb. 4:

Synthese von ds-cDNA mit Reverser Transkriptase.

In der Literatur wird zur Klonierung doppelsträngiger cDNA von RNA-Viren üblicherweise auch die Synthese des zweiten cDNA-Stranges mit Reverser Transkriptase durchgeführt, wie auf dem abgebildeten Schema dargestellt. Die Bildung einer "Haarnadel"-Struktur am 3'-Ende des ersten cDNA-Stranges, die als Primer fungieren kann, ist die Voraussetzung zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges.

Die zunächst versuchte Reaktion mit Reverser Transkriptase brachte auch bei Variation der Versuchsbedingungen (Zeit, Salzkonzentration, dNTP-Konzentration) kaum Einbau an ^{35}S -dAMP. Die Werte lagen im Background-Bereich. Schwierigkeiten bei der Synthese des zweiten cDNA-Stranges mit der Reversen Transkriptase wurden auch von Rougeon und Mach (1976) bei AMV-RNA beschrieben. Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung von DNA-abhängiger DNA-Polymerase I (Efstratiadis et al. 1976) dar. Dabei ist es von Vorteil, das Klenow-Fragment zu wählen, da diesem die 3'-5'-Exonukleaseaktivität fehlt (Maniatis et al. 1982). Aber auch bei Verwendung dieses Enzyms blieben die Werte der Doppelstrang-Synthese von 6/94-cDNA nahezu im Background-Bereich. Im Kontrollansatz mit dem synthetischen Homopolymer Poly(dG) und dem Primer Oligo(dC) wurde jedoch für das Enzym die vom Hersteller angegebene, optimale Einbaurate erzielt.

Auf Grund dieser Ergebnisse mußte vermutet werden, daß im Fall der 6/94-RNA durch die Reverse Transkription keine "Haarnadel"-Struktur gebildet wird und damit der Primer fehlt. Um nun ein Startsignal zu schaffen, wurde zunächst mit terminaler DNA-Transferase das 3'-Ende der ss cDNA-Moleküle durch eine Poly(C)-Kette verlängert. Das Enzym katalysiert die Addition von Deoxymononukleotiden ans 3'-OH-Ende von DNA-Molekülen (Bollum 1974) und arbeitet sowohl an ss DNA als auch an ds DNA (Roychoudhury et al. 1976). Die Synthese der Poly(dC)-Kette wurde in Vorexperimenten mit Plasmid-DNA und ^3H -dCTP so optimiert, daß reproduzierbar in 20 min bei 37°C und 7 Enzymeinheiten an 100 ng ss cDNA 20 bis 40 Nukleotide angehängt werden. Die Durchschnittswerte der Optimierung sind aus der Tabelle 4 zu entnehmen. Die eingesetzte Plasmid-DNA wurde vor der Reaktion durch Erhitzen in Einzelstränge aufgespalten.

Tabelle 4: Tailing der ss cDNA mit dCTP

cpm im Ansatz:	5000
Umrechnungsfaktor:	51
(vgl. Tabelle 3)	
Eingebaute pmol dCMP:	31
Eingebaute Moleküle dCMP:	$18,6 \times 10^{12}$
Eingebaute Moleküle dCMP	
pro ss Molekül pBR327:	20

Nach Verlängern der 6/94 ss cDNA mit dC₂₀₋₄₀ und Zugabe von Oligo(dG) als Primer lief die Doppelstrangsynthese dann sofort erfolgreich ab. Die Reaktionstemperatur von 15°C soll dabei Rückfaltungen der ss cDNA-Moleküle vermeiden (Maniatis et al. 1982). Der Umweg über die Poly(dC)-Kette und den korrespondierenden Oligo(dG)-Primer scheint für die Synthese der ds 6/94-cDNA, im Gegensatz zu der Klonierungsprozedur bei Sendaivirus-RNA (Shioda et al. 1983), unbedingt notwendig zu sein. Gemessen an den eingebauten ³⁵S-markierten Nukleotiden ergab sich eine Synthese-Effizienz der Doppelstrangsynthese von mindestens 7%. Das bedeutet eine Ausbeute von etwa 100 ng ds cDNA beim Einsatz von 1 µg ss cDNA. Da die 100 ng ds cDNA an 10 µg 50S-RNA synthetisiert wurden, beträgt die Gesamtausbeute an ds cDNA 1%.

3.2.3. Charakterisierung der ds cDNA

Die erhaltene cDNA wurde nun auf ihre Doppelsträngigkeit geprüft. Das einzelstrangspezifische Enzym S1-Nuklease verdaut die einzelsträngigen Bereiche der ds cDNA, sowie entstandene "loops" und die verbliebene 6/94-RNA. Es resultiert eine ds cDNA mit stumpfen Enden.

Im S1-Ansatz müssen hierzu aber spezielle Bedingungen eingehalten werden: Eine hohe Salzkonzentration im Ansatz verhindert Einzelstrangbrüche, die auch in ursprünglich doppelsträngigen Bereichen entstehen können (Vogt 1973).

Außerdem stabilisieren hohe Ionenkonzentrationen die Doppelstrangmoleküle. Durch die niedrige Enzymkonzentration von 0,1 Einheiten S1-Nuklease pro 1 µg ds cDNA und die kurze Inkubationszeit von 10 min sollte erreicht werden, daß nachweislich vorhandene Kontaminationen mit anderen Nukleasen nicht zum Tragen kommen (Vogt, 1973; Wiegand et al. 1975).

Die Effizienz des Nuklease S1-Verdaus unter diesen Bedingungen wurde getestet, indem mit dem Restriktionsenzym Pst I verdaute DNA des Bakteriophagen lambda im beschriebenen S1-Ansatz inkubiert wurde (Abb. 5, Spur 1). Es zeigte sich, daß in einer darauf folgenden Ligierung mit Bedingungen für überstehende Enden (Kapitel 2.3.17.) die Fragmente nicht religiert wurden, da überstehende einzelsträngige Bereiche abverdaut worden waren (Abb. 5, Spur 3). Das Bandenmuster der Restriktionsfragmente blieb deshalb erhalten. Nicht mit S1-Nuklease behandelte lambda-Fragmente ließen sich mit niedriger Konzentration an T4-Ligase wieder zur vollen Ausgangslänge verbinden (Abb. 5, Spur 2).

Die synthetisierte 6/94-cDNA erwies sich unter diesen Bedingungen zu 80% als S1-resistent und war damit als Doppelstrang charakterisiert. Die Abnahme der ³H-Aktivität im S1-Verdau war dabei deutlich größer als der Verlust an ³⁵S-Aktivität, woraus geschlossen werden kann, daß der erste Strang nicht vollständig komplementiert wurde (Tabelle 3). Die als Doppelstrang charakterisierte cDNA wurde nach Nuklease-S1-Behandlung elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 6). Die Autoradiographie zeigt wie erwartet, daß die Reverse Transkription an dem 15 kb RNA-Template (Kolakofsky et al. 1974) zu unterschiedlich langen Syntheseprodukten geführt hat. Denn sowohl die Reverse Transkriptase, als auch die DNA-Polymerase können an mehreren, verschiedenen Sequenzen im Template die Synthese beenden (Efstratiadis et al. 1976). Die Größe der ds cDNA nach Behandlung mit S1-Nuklease, reicht von sehr kleinen Fragmenten von circa 100 bp bis zu



Abb. 5:

Bestimmung der optimalen S1-Nuklease Konzentration.

Mit Pst I-verdaute lambda-DNA wurde mit 0,1 U S1-Nuklease pro ug DNA für 10 min. bei 45°C inkubiert und die entstandenen Restriktionsfragmente mit 10 U T4-Ligase pro ug DNA religiert. Die DNA wurde in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Spur 1: 2 ug lambda-DNA nach Restriktion mit Pst I und Inkubation mit S1-Nuklease.

Spur 2: 2 ug lambda-DNA nach Restriktion mit Pst I und anschließendem Religieren der Fragmente.

Spur 3: 2 ug lambda-DNA nach Restriktion mit Pst I, Behandlung mit S1-Nuklease und anschließender Inkubation mit T4-Ligase.

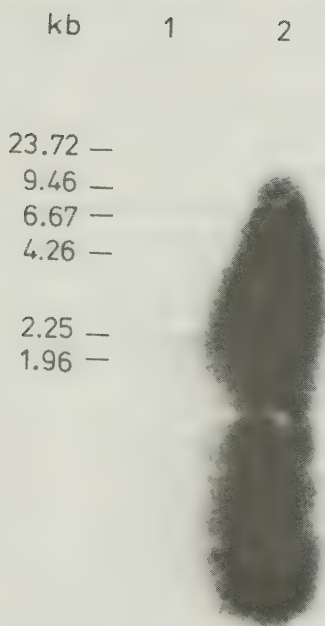


Abb. 6:

Analyse der 6/94 ST ds-cDNA nach S1-Verdau.

^3H - und ^{35}S - markierte 6/94 ST-RNA wurde mit 0,01 U S1-Nuklease pro 100 ng ds-cDNA für 10 min. bei 45°C inkubiert. 5 ng der 6/94 ST-ds-cDNA, nach Messung im ^{14}C -Kanal des Szintillationszählers etwa 10 000 cpm, wurden dann in einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 2). Als Längenstandard wurden in Spur 1 25 000 cpm eines radioaktiven ^3H -markierten DNA-Markers (NEN) eingesetzt. Zur Verstärkung der Autoradiographie wurde das Agarosegel fluorographiert, indem es zunächst in H_2O gewaschen; dann mindestens 30 min. in Methanol und anschließend 1 h in Methanol mit 10% PPO gelegt wird. Nach weiteren 30 min. in H_2O wurde das Gel getrocknet und 43 Stunden exponiert.

Kopien von voller Genomlänge (Abb. 6). Die Synthese einer cDNA von solcher Länge ist bisher nicht beschrieben worden.

3.2.4. Die Klonierungsvektoren

Als Vektoren zur Klonierung der 6/94 ds cDNA wurden spezielle Mutanten des Bakteriophagen lambda gewählt. Durch die in vitro Verpackung rekombinanter DNA, bei der wieder infektiöse Phagen entstehen, ist die Klonierungseffizienz dieses Systems besonders hoch. Die verwendeten Vektoren 728 und 762 wurden von N. Murray konstruiert (Murray et al. 1977) und sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Für die Verpackung der lambda-DNA in Phagenköpfe sind die cos-Bereiche auf der lambda-DNA wichtig; es wird nur DNA zwischen zwei cos-Stellen verpackt. Der Abstand zwischen diesen beiden Stellen darf nur um einen bestimmten Betrag variieren. Er muß mindestens 73% und darf höchstens 108% (Enquist und Sterberg 1979) des Wildtyp-Genoms betragen. Ist der Abstand zwischen den cos-Stellen zu groß, kann aus Platzgründen nicht die gesamte DNA verpackt werden. Wird eine bestimmte Länge unterschritten, führt das ebenfalls nicht zu vermehrungsfähigen Phagen. Lambda-Vektoren sind daher so konstruiert, daß sie entweder gerade noch die Mindestlänge haben und bis zur Maximallänge fremde DNA aufnehmen können (Insertionsvektoren), oder daß ein für den Phagen nicht essentieller Bereich gegen fremde DNA ausgetauscht werden kann (Replacementvektoren).

Der Insertionsvektor 728 hat eine maximale Aufnahmekapazität für fremde DNA von 12 kb, akzeptiert aber auch wenige Nukleotide als Insert. In der Restriktionsanalyse mit Hind III ergibt sich die Länge der zwei Vektorarme mit 27,4 und 11,2 kb (Abb. 8, Spur 3). Die einzige Hind III-Schnittstelle dieses Vektors liegt im cI-Repressorgen, welches für die Aufrechterhaltung des lysogenen Zustands, in dem sich der Phage lambda nicht vermehrt, verantwortlich ist. Phagen mit einem intakten cI-Repressorgen ergeben auf E. coli

Indikatorbakterien trübe Plaques. Auch die Ligation der Vektorarme allein ergibt nach der in vitro Verpackung trübe Plaques, falls der cI -Repressor intakt bleibt. Insertion rekombinanter DNA an dieser Stelle führt dagegen immer zur Zerstörung des cI -Repressorgens und damit zu klaren Plaques.

Eine Selektion auf rekombinante 728-Phagen ist mit *E. coli* Popl3B besonders gut möglich. Auf *E. coli* Popl3B erzeugen nur rekombinante Phagen Plaques. Dieser Stamm besitzt nämlich eine Mutation im bakteriellen Gen *lyc*, das die Lysogenie positiv beeinflußt. Die Mutation *lyc* 7 verschiebt das Verhältnis noch stärker zu Gunsten der Lysogenie, indem sie zur Überproduktion von cI -Repressor führt und damit nahezu 100%-ig den lysogenen Zustand erhält. Bei Phagen mit einem Defekt im cI -Repressorgen hat die erhöhte Produktion des defekten Repressors keinen Einfluß auf die Lysogenie, die Phagen können deshalb Plaques - und zwar klare - bilden. Popl3B erlaubt also nur die Vermehrung von "Klarplaque"-Phagen. Im Falle des Vektors 728 sollten das nur solche mit einem Insert im cI -Gen sein. Ein relativ hoher Background des Systems kann dadurch entstehen, daß bei nicht exakter Religierung der Vektorarme eine Zerstörung des cI -Repressorgens auch ohne Insertion von DNA bewirkt wird.

Der Replacementvektor 762 besitzt zwei Hind III-Schnittstellen. Bei Restriktion mit Hind III ergeben sich drei Fragmente, die beiden Vektorarme mit 21,8 und 11,7 kb und das *supF*-Fragment mit 7,7 kb, das dem Phagen die nötige Genomlänge verleiht (Abb. 8, Spur 5). Die maximale Aufnahmekapazität dieses Vektors für fremde DNA beträgt 18 kb, kleine DNA-Fragmente (z.B. solche unter einer Größe von 1 kb) ergeben bei Ligierung mit den Vektor-Armen keine vermehrungsfähigen Phagen. Das Prinzip dieses Vektorsystems beruht auf einem Austausch des *supF*-Fragments gegen ein fremdes DNA-Stück.

Um bei der Ligierung von Vektor-Armen und Insert den Anteil an ursprünglichen Vektorphagen 762 stark zu

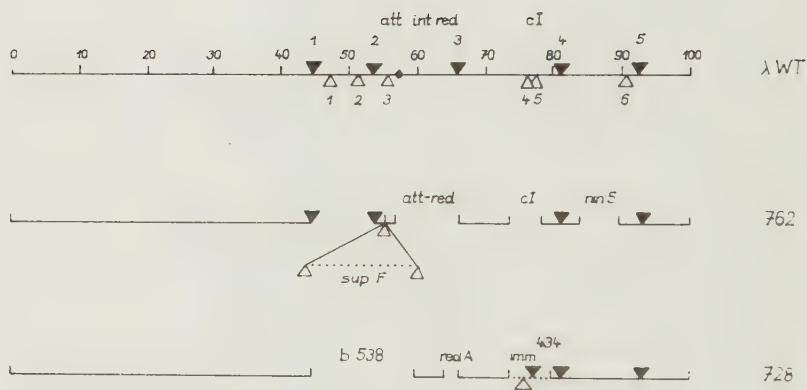


Abb. 7:

Genomkarte des Bakteriophagen lambda und der Klonierungsvektoren lambda-762 und -728.

Die obere Genomkarte zeigt einige wichtige Gene des Phagen lambda (WT=lambda-Wildtyp), sowie die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme Eco RI und Hind III. Diese Karte dient als Vergleich mit denen der Klonierungsvektoren 762 und 728 (Murray et al. 1977). 762 ist ein Replacementvektor, 728 ein Insertionsvektor. Die Zwischenräume geben die Position der Deletionen an, die gestrichelten Linien stehen für Substitutionen.

▼ Eco RI-Schnittstelle

△ Hind III-Schnittstelle

att ♦ "Attachment site"

Außerdem sind noch folgende Gene oder Genombereiche eingezeichnet:

int für die Integration notwendiges Gen.

red(A) Gen für Rekombinationsfähigkeit.

cI Repressor, der für die Aufrechterhaltung der Lysogenie verantwortlich ist.

supF Supressor F ist ein bakterielles Gen, das amber-Mutationen supprimiert.

nin 5, b 538 Deletionen, die bei den Vektoren hauptsächlich den Sinn haben, Platz für Insertionen zu schaffen.

imm 434 Immunitätsregion, die bei 728 anstelle der Immunitätsregion des lambda-WT verwendet wurde, da imm 434 nur eine Hind III-Schnittstelle im cI-Repressor trägt, was für die Verwendbarkeit als Klonierungsvektor wichtig ist.

vermindern, wurde das supF-Fragment über ein präparatives Agarosegel von den Vektor-Armen getrennt. Anschließend wurden die Vektorarme mit der Fremd-DNA ligiert und in vitro verpackt. Es können sich nur Phagen mit inserierter DNA bilden. Eine Ligation der Vektorarme allein kann nicht zu infektiösen Phagen führen, da die minimale, verpackungsfähige Genomlänge unterschritten wird. Entstandene Plaques enthalten also entweder die gewünschte DNA als Insert oder das supF-Fragment, das sich auch über ein präparatives Gel nie völlig entfernen läßt und ebenfalls zur Plaquebildung führt. Bei der Auswertung der Experimente müssen diese Plaques als Background des Systems berücksichtigt werden.

Die Background-Plaques können mit Hilfe von E. coli 430 identifiziert werden. Dieser Stamm trägt eine amber-Mutation im lac-Gen (Jacob und Monod 1961; Horwitz 1964), genauer im beta-Galaktosidasegen lac Z. Dies führt zu einer defekten beta-Galaktosidase und es kann daher kein Laktoseabbau stattfinden. Das bakterielle Gen supF, das im Vektor 762 enthalten ist, supprimiert amber-Mutanten, die durch Mutation ein Stop-Kodon innerhalb eines kodierenden Bereichs tragen, indem es für die entsprechend mutierte tRNA kodiert. Die amber-Mutation im lac Z wird daher vom supF-Fragment des intakten 762-Phagen komplementiert, was zur Synthese einer funktionierenden beta-Galaktosidase führt und damit den Laktoseabbau ermöglicht. Diese Reaktion läßt sich sichtbar machen, wenn sich Phagen und Bakterien auf Platten vermehren, die 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Galaktosid (X-Gal) enthalten. X-Gal ist ein synthetisches Substrat für die beta-Galaktosidase, die hierbei die Abspaltung von Indol katalysiert. Das freie Indol wird als blauer Farbstoff sichtbar. Blaue Plaques enthalten also Phagen mit supF-DNA, während rekombinante Phagen ohne supF weiße Plaques bilden. Ein Nachteil des Systems liegt darin, daß Phagen, die supF- und zusätzlich eingebaute Fragmente enthalten, mit dieser Methode nicht vom ursprünglichen Vektor 762 unterschieden werden können.

Bei der Klonierung selbst wurde zunächst E. coli 490 an Stelle von E. coli 430 verwendet, da wegen der Trennung der Vektorarme vom supF-Fragment nicht das Vorhandensein von supF getestet werden mußte. E. coli 490 ist rekombinationsdefekt, wodurch eine nachträgliche Veränderung des klonierten Inserts verhindert wird. Dieser Stamm ist, ebenso wie Pop13B, nicht zur Restriktion fähig, kann also die nicht durch Modifikation geschützte, fremde DNA nicht abbauen.

3.2.5. Ligierungsbedingungen

Zunächst wurde in Kontrollexperimenten das aus dem Gel eluierte supF-Fragment mit den beiden Vektorsystemen 728 und 762 ligiert. Die Bedingungen wurden dabei so gewählt, daß die Bildung von Polymeren gegenüber monomeren Ringen bevorzugt ist. Dabei sind die Konzentrationen an DNA von Vektor und Insert von entscheidender Bedeutung. Die Berechnung der optimalen Konzentrationen von Vektor- und supF-DNA erfolgte nach Dugaiczyk et al. (1975). Dabei bedeuten i die Anzahl der Moleküle pro ml, j die Anzahl der Enden in der Nachbarschaft des anderen Endes des selben Moleküls pro ml, (DNA) die DNA-Konzentration in g/l, und MW das Molekulargewicht in Dalton (d). Es gelten folgende Formeln:

$$(1) i = 12,044 \times 10^{20} \text{ (DNA) / MW}$$

$$(2) \text{ (DNA) } = i \times \text{MW} : (12,044 \times 10^{20})$$

$$(3) \text{ (DNA) } = 51,1 : (\text{MW}^{0.5} \times j/i)$$

Werte für j/i kleiner als 1 führen zur Bildung von Polymeren, diejenigen für j/i größer als 1 zu monomeren Ringen.

Für die Vektorarme ergibt sich bei 762:

$$21,8 \text{ kb} = 14,4 \text{ Md, bzw.}$$

$$11,7 \text{ kb} = 7,7 \text{ Md, insgesamt also}$$

$$22,1 \text{ Md;}$$

Für das supF-Fragment:

$$7,7 \text{ kb} = 5,1 \text{ Md.}$$

Wenn vom Grenzwert zwischen der Bildung von Polymeren und

Ringen ($j/i = 1$) ausgegangen wird, errechnet sich aus (3) für supF die Konzentration der DNA 0,022 g/l, aus (1) die Anzahl der Enden mit $5,19 \times 10^{12}$ /ml. Wenn das supF-Fragment mit den Vektor-Armen ligiert werden soll, muß ein entsprechender Anteil dieser Enden vom Vektor gestellt werden. Für das Verhältnis von Vektor : Insert = 2 : 1 ist der Vektoranteil $3,46 \times 10^{12}$ /ml, der Insertanteil $1,73 \times 10^{12}$ /ml. Mit diesen Werten ergibt sich aus (3) eine DNA-Konzentration für das supF-Fragment von 0,0073 g/l, für die Vektorarme von 0,063 g/l. Bei doppelter Konzentration an Vektor- und Insert-DNA wird der Wert j/i mit Sicherheit kleiner als 1 und folglich bei einer Konzentration von 0,0146 g/l supF-DNA und 0,126 g/l Vektor-DNA die Bildung polymerer DNA bevorzugt. Da sich unter diesen Bedingungen sehr kleine Moleküle zu Ringen schließen, wird dabei auf die Klonierung größerer DNA-Fragmente selektiert. Gemäß der errechneten DNA-Konzentrationen wurden als Kontrollversuch Ligationsansätze von 728- bzw. 762-DNA mit supF-DNA nach der in Kapitel 2.3.17. beschriebenen Methode in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt. Die ligierte Vektor- und Insert-DNA waren damit zur in vitro Verpackung vorbereitet.

3.2.6. Das in vitro Verpackungssystem

Bei der Verpackung der DNA des Phagen lambda ist das Vorhandensein mehrerer viraler Proteine in einer bestimmten Reihenfolge nötig. Der Prozeß wird deshalb an der Stelle unterbrochen, an der das für den nächsten Schritt benötigte Protein fehlt. Dieser Effekt wird durch die in vitro Verpackung ausgenutzt: Zwei Bakterienstämme, die integrierte Prophagen mit Mutationen in unterschiedlichen, für die Verpackung notwendigen Genen tragen, ergeben Extrakte, die zusammengemischt die Vorstufen aller für den Prozeß notwendiger Bestandteile enthalten. Es werden dabei zwei Prophagen verwendet, von denen jeder für ein anderes Kopfprotein defekt ist. Die natürliche Infektion mit Hilfe der Phagen erleichtert das Eindringen der DNA in die Bakterienzelle und erhöht somit die Klonierungseffizienz.

Mit den Verpackungsextrakten wurde die ligierte DNA des Kontrollansatzes aus 3.2.5. in vitro verpackt und die entstandenen Phagen auf *E. coli* Popl3B für 728 bzw. auf *E. coli* 490 für 762 titriert. Folgende Verpackungsansätze wurden verglichen: Ungeschnittene, mit Hind III geschnittene, mit sich selbst religierte, und mit supF-DNA ligierte Phagen-DNA (Tabelle 5). Die Ergebnisse wurden auf die Anzahl der Plaques pro eingesetzte Vektor-DNA umgerechnet. Abzüglich der Background-Werte liegt bei Ligation mit Insert-DNA die Verpackungseffizienz des Systems 728/Popl3B bei $1,9 \times 10^6$ pfu/ug DNA, für 762/490 bei $4,4 \times 10^5$ pfu/ug DNA. In diesem Kontrollversuch konnte also Folgendes ermittelt werden: Beim Einsatz von 146 ng Insert-DNA und 1,26 ug Vektor-DNA sind unter den entsprechenden Bedingungen (Kapitel 2.3.17.) in einem Ligationsansatz von 10 ul $1,9 \times 10^6$ Klone mit dem Vektor-System 728 und $4,4 \times 10^5$ Klone mit dem Vektor-System 762 zu erwarten.

3.2.7. Klonierung der 6/94-cDNA

Die ds cDNA sollte nun mit Hilfe der beiden Vektoren 728 und 762 kloniert werden. Nach der in Kapitel 3.2.3. beschriebenen Nuklease Sl-Behandlung liegt die ds cDNA mit stumpfen Enden vor. Eine Möglichkeit der Klonierung hätte somit darin bestanden, die cDNA mit den Vektor-Armen über stumpfe Enden zu ligieren. Hierzu wäre es zunächst nötig gewesen, auch die Vektor-DNA mit Sl-Nuklease zu behandeln. Ein Nachteil, der sich bei der Ligierung stumpfer Enden ergibt, besteht im Fehlen einer Restriktionsstelle, die Vektor und Insert genau voneinander trennt. Für spätere Hybridisierungsexperimente sollte, um die Spezifität der klonierten 6/94-cDNA nicht zu beeinträchtigen, nur vektorfreie DNA verwendet werden. Auch eine Subklonierung der 6/94-cDNA in Plasmide, wie sie z.B. für die Sequenzierung der klonierten DNA nötig ist, erfordert die Trennbarkeit der insertierten DNA von der DNA des Vektors. Es wurde deshalb bei der Klonierung von 6/94-cDNA der Weg gewählt, die Vektor-Arme und die cDNA durch Ligierung

Tabelle 5:Kontrollversuch zur in vitro Verpackung von150 ng Insert-DNA (supF) mit den lambda-Vektoren 728 und 762

E. coli pop13B	
pfu/ug Vektor	
728 ungeschnitten	3×10^3
728 Hind III	< 10
728 Hind III ligiert	9×10^4 (Background)
728 Hind III + supF	< 10
728 Hind III + supF ligiert	2×10^6 (Klonierung von supF)
E. coli 490	
pfu/ug Vektorarme	
762, ungeschnitten	$7,1 \times 10^6$
762, Hind III	$2,6 \times 10^3$
762, Hind III, ligiert	$8,8 \times 10^5$
762 Arme + supF	$1,7 \times 10^3$
762 Arme + supF, ligiert	$4,4 \times 10^5$ (Klonierung von supF)
762 Arme, ligiert	$8,8 \times 10^3$ (Background)

überstehender Hind III-Enden zu verbinden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß eine Hind III-Schnittstelle zwischen Vektor- und Insert-DNA entsteht und Ligierungsbedingungen gewählt werden können, welche die Bildung polymerer DNA aus Vektor und Insert begünstigen (Kapitel 3.2.5.).

Wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben und in der Abbildung 8 ersichtlich, liegt die Vektor-DNA bereits mit Hind III-Enden vor. Der Restriktionsverdau der ds cDNA zur Erzeugung der entsprechenden überstehenden Hind III-Enden ist jedoch problematisch. Falls die ds cDNA Erkennungsstellen für dieses Enzym besitzt, wird sie intern geschnitten und kann dann nur in mehreren, verkürzten Fragmenten kloniert werden. Dadurch wird die strukturelle Analyse genomischer cDNA sehr erschwert. Derartige Schwierigkeiten bei der Klonierung von viraler cDNA wurden bereits von Scheller et al. (1977) beschrieben. Da Hind III im Allgemeinen kein sehr häufig schneidendes Enzym ist, und in der Literatur zum Zeitpunkt der Klonierungsexperimente keine Anhaltspunkte über eventuelle Hind III-Schnittstellen gefunden werden konnten, wurde bei der Klonierung von 6/94-cDNA dieser mögliche Nachteil in Kauf genommen. In der Hoffnung, daß keine internen Schnittstellen für Hind III in der 6/94-cDNA existieren, wurden die Enden erst mit synthetischen Linkermolekülen für Hind III versehen. Hind III-Linkermoleküle sind 10 bp lange, ds DNA-Moleküle mit stumpfen Enden. Die Ligierung der 6/94-cDNA erfordert also von beiden Partnern stumpfe Enden. Der S1-Verdau der ds cDNA (Kapitel 3.2.3.) diente also neben der beschriebenen Charakterisierung der ds cDNA auch dazu, die zur Ligierung mit den Linkermolekülen nötigen stumpfen Enden zu erzeugen. Die überstehenden Hind III-Enden, die dann zur Ligation mit den Vektorarmen benötigt werden, entstehen erst durch anschließende Inkubation mit dem Restriktionsenzym.

Mit 20-fachem molaren Überschuß an Hind III-Linkermolekülen wurden nun, wie im Kapitel 2.3.17. beschrieben, mit

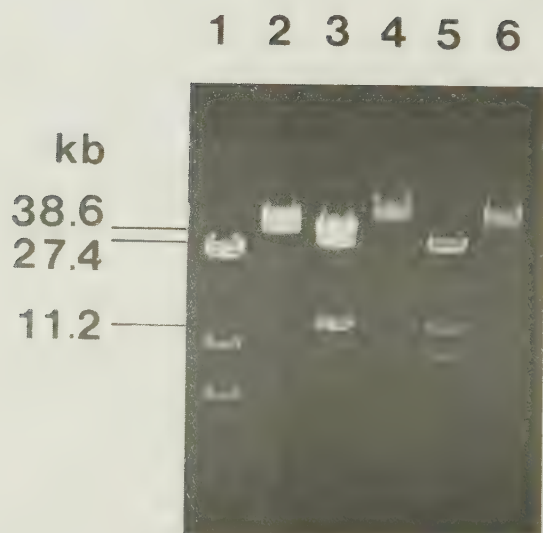


Abb. 8:

Restriktionsverdau und Religierung der Klonierungsvektoren lambda-728 und -762.

Die zur Klonierung von 6/94 ST-ds-cDNA verwendeten Vektoren lambda-728 und -762 wurden mit dem Restriktionsenzym Hind III verdaut und in einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Verwendbarkeit der Vektor-DNA für die in vitro Verpackung zu testen, wurden die entstandenen Restriktionsfragmente unter den im Kapitel 2.3.17. beschriebenen Bedingungen für überstehende DNA-Enden religiert.

- Spur 1: Als Längenstandard 2 ug mit Hind III-verdaute lambda-DNA, wobei die vier größten Fragmente mit 23,72 kb, 9,46 kb, 6,67 kb und 4,26 kb zu sehen sind.
- Spur 2: 0,5 ug lambda-728-DNA mit einer Gesamtlänge von 38,6 kb.
- Spur 3: 0,5 ug lambda-728-DNA nach Restriktionsverdau mit Hind III, wobei die beiden Vektorarme mit 27,4 kb und 11,2 kb entstehen.
- Spur 4: Die beiden Arme des Vektors lambda-728 (insgesamt 0,5 ug) religiert.
- Spur 5: 0,5 ug lambda-762-DNA nach Restriktionsverdau mit Hind III, wobei sich drei Fragmente ergeben: Die beiden Vektorarme mit 21,8 kb und 11,7 kb und das supF-Fragment mit 7,7 kb.
- Spur 6: Die Hind III-Fragmente von lambda-762 (insgesamt 0,5 ug) religiert.

T4-DNA-Ligase polymere Linkersequenzen an die cDNA-Enden angefügt (Sugino et al. 1977; Maniatis et al. 1982). Anschließend wurde die 6/94-cDNA mit dem Restriktionsenzym Hind III in der Linkersequenz geschnitten und dadurch die zur Klonierung erforderlichen, überstehenden Enden erzeugt.

Um zu verhindern, daß die durch Verdau mit Hind III abgespaltenen, kleinen Linker-Reste mit den Hind III-Enden der cDNA im Ligierungsansatz konkurrieren, wurde die cDNA mit Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB) präzipitiert. Bei der CTAB-Fällung bleiben DNA-Moleküle, die kleiner als 10 bp sind, in Lösung.

Die mit Hind III-Enden versehene 6/94-cDNA wurde schließlich mit den Hind III geschnittenen Vektor-Armen ligiert. Dabei wurden die im Vorversuch (Kapitel 3.2.5.) ermittelten Bedingungen gewählt. Die ligierte DNA wurde in vitro verpackt und die dabei entstehenden Phagen auf 500 cm² großen Agaroseplatten ausplattiert. Es wurde folgendes Ergebnis erzielt:

	728	762
	pfu/ug Vektor-DNA	pfu/ug Vektor-DNA
Vektor-Arme (Background)	9×10^4	8×10^3
Vektor-Arme + 6/94-cDNA	4×10^4	100
max. erreichbar mit 50 ng cDNA	6×10^5	$1,5 \times 10^4$

Es entstanden also, wie im Kontrollversuch (Tabelle 5) viele 728-Phagen mit zerstörtem cI-Repressor ohne Fremd-Insert,

bzw. 762-Phagen mit supF als Insert (vgl. Kapitel 3.2.4.). In beiden Klonierungssystemen liegen die mit 6/94-cDNA erhaltenen Werte im bereits beschriebenen Background-Bereich. Da aber insgesamt nur 100 ng ds cDNA zur Verfügung stand, konnten nur 50 ng 6/94-cDNA für jedes der beiden Vektorsysteme eingesetzt werden, also dreimal weniger als im Kontrollversuch. Entsprechend dem Ergebnis des Kontrollversuchs (Kapitel 3.2.6.), bei dem in jedem Vektorsystem 146 ng supF-Fragment eingesetzt wurden, wären bei 50 ng 6/94 cDNA als Insert im eigentlichen Klonierungsexperiment höchstens ein Drittel der Plaques, also 6×10^5 pfu/ug 728-DNA und $1,5 \times 10^4$ pfu/ug 762-DNA, erreichbar gewesen, was nur um den Faktor 6 bzw. 2 über dem Background der Systeme liegt.

Die tatsächlich mit 6/94-cDNA erhaltenen Werte sind jedoch noch deutlich niedriger. Dieses Phänomen kann auf verschiedene Weise erklärt werden: Entweder enthielt die 6/94-cDNA einen Störfaktor für die in vitro Verpackung. Möglich ist auch, daß die vorangegangenen Ligierungen nicht optimal erfolgt waren oder daß der Restriktionsverdau der cDNA in der Linkersequenz nicht effizient ablief. Das konnte jedoch nicht überprüft werden, da die geringe Menge an 6/94-cDNA eine direkte Kontrolle dieser Schritte, z.B. auf einem analytischen Agarosegel, nicht erlaubt hätte.

Da die System-spezifische Selektion nicht ausgereicht hätte, rekombinante Phagen zu identifizieren, mußten weitere Methoden eingesetzt werden.

3.2.8. Suche nach rekombinanten Phagen mit 6/94-DNA

Um unter den, aus dem Experiment mit dem Vektor 728 erhaltenen Plaques diejenigen zu finden, welche 6/94-spezifische DNA enthalten, wurden die Plaques, wie im Kapitel 2.3.18.4. beschrieben, auf Nitrozellulose-Filter übertragen und ihre DNA an das Filter gebunden. Diese DNA wurde dann mit ^{32}P -endmarkierter 6/94-RNA hybridisiert. Der Vergleich der Duplikatfilter erbrachte zwei deutlich 6/94-positive

Plaques. Diese wurden über Einzelplaques gereinigt und durch erneute Filterhybridisierung abermals überprüft. Abbildung 9 zeigt die Hybridisierung der Phagen-DNA mit ^{32}P -endmarkierter 6/94-50S-RNA nach der ersten Reinigung. Die Duplikatfilter (A und B) zeigen die positiven Hybridisierungssignale an den korrespondierenden Stellen. Es wurden mit dem Vektor 728 aus insgesamt 4×10^4 pfu zunächst zwei 6/94-positive Klone nachgewiesen, die mit W (Abb. 9a) und E (Abb. 9b) bezeichnet wurden. Diese Phagen wurden nun vermehrt und ihre DNA nach der Methode von Enquist und Sternberg (1979) isoliert, um sie näher charakterisieren zu können.

Die erhaltenen lambda 762-Phagen wurden mit Hilfe von E. coli 430 und X-Gal-Platten zunächst auf die Anwesenheit des supF-Fragments überprüft. Unter den 100 Plaques wurden 5 weiße gefunden, die kein supF-Fragment, sondern ein anderes Insert enthalten mußten. Ob diese rekombinanten Phagen 6/94-spezifische Inserts tragen, mußte aber noch untersucht werden. Hierzu wurden die lambda-762-Phagen aus den weißen Plaques vermehrt und ihre DNA isoliert.

3.3. Nachweis der Spezifität der Klone

3.3.1. Southern Blot Analyse

Die DNA der erhaltenen Klone mußte durch Hybridisierung mit ^{32}P -endmarkierter 6/94-50 S-RNA im Southern Blot auf ihre virale Spezifität untersucht werden.

Zunächst wurde die DNA der Klone E und W mit Hind III verdaut und die entstandenen Restriktionsfragmente im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. In der Abbildung 10 A (Spur 3 und 6) läßt sich die Größe der klonierten Fragmente von E und W durch Vergleich mit dem lambda-Marker (Spur 1) errechnen. Klon E enthält ein DNA-Insert von 6,9 kb, Klon W von 1,3 kb. Nachdem die DNA-Fragmente auf Nitrozellulose-Filter übertragen wurden, erfolgte die Hybridisierung mit ^{32}P -endmarkierter 6/94-50S-RNA. In der

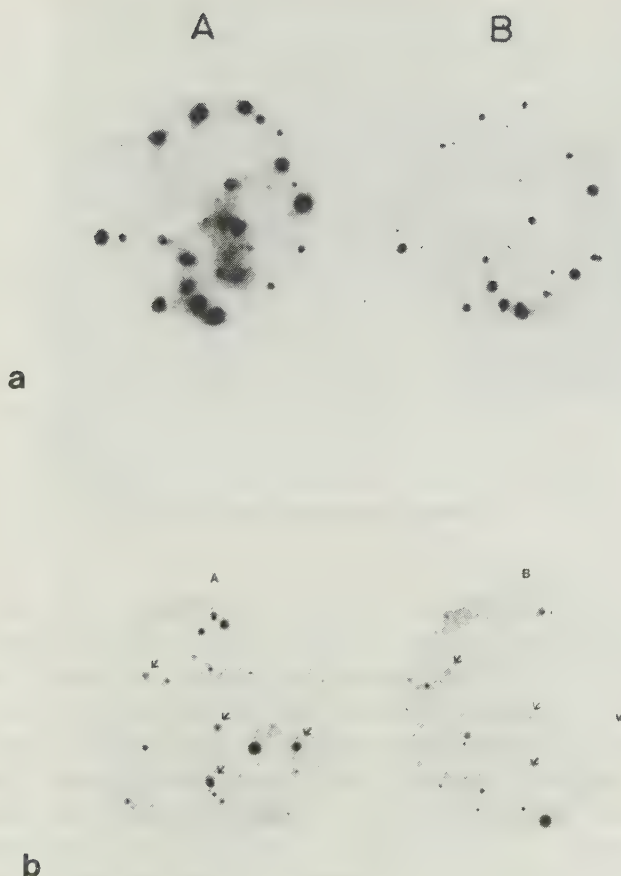


Abb. 9:

Plaque-Hybridisierung der Klone W und E.

Nach Reinigung über Einzelplaques wurden die Phagen auf Nitrozellulose übertragen, die Phagen-DNA mit ^{32}P -endmarkierter 6/94 ST-50S-RNA hybridisiert und autoradiographiert (Abb. 9a: Klon W; Abb. 9b: Klon E). Die jeweiligen Duplikatfilter A und B wurden von der selben Platte abgenommen, die insgesamt etwa 100 Plaques enthielt.

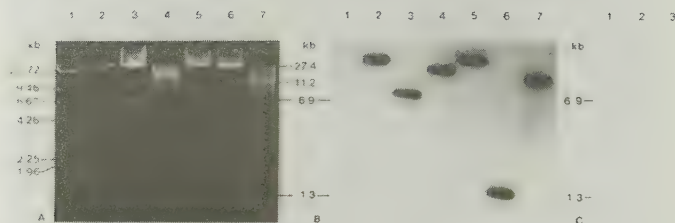


Abb. 10:

Charakterisierung der DNA von Klon E und W durch Hybridisierung mit ^{32}P -endmarkierter 6/94 ST-50S-RNA im Southern Blot.

Je 2 μg Hind III-verdaute lambda-DNA als Längenstandard (Spur 1), ungeschnittene Klon E-DNA (Spur 2), mit Hind III- (Spur 3) oder Sma I- (Spur 4) verdaute Klon E-DNA, ungeschnittene Klon W-DNA (Spur 5), mit Hind III- (Spur 6) oder Sma I- (Spur 7) verdaute Klon W-DNA wurden in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, die DNA mit Ethidiumbromid (A) angefärbt und anschließend auf einem Nitrozellulose-Filter übertragen. Der Nitrozellulose-Filter wurde mit ^{32}P -endmarkierter 6/94 ST-50S-RNA hybridisiert und autoradiographiert (B).

Die Abbildung C zeigt als Negativkontrolle die Hybridisierung von DNA des Vektors lambda-728 (Spur 1), von Klon E-DNA (Spur 2) und von W-DNA (Spur 3), nach Hind III Verdau mit ^{32}P -endmarkierter, zellulärer Gesamt-RNA aus embryonalen Hühnerfibroblasten (C).

Autoradiographie (Abb. 10 B) zeigt sich deutlich, daß nur die klonierten Fragmente mit der 6/94-RNA hybridisieren (Spur 3 und 6). Um eine Kontamination der klonierten DNA mit zellulären Sequenzen auszuschließen, wurde 5'-endmarkierte RNA aus nicht-infizierten, embryonalen Hühnerzellen als Negativ-Kontrolle in einem Parallelexperiment eingesetzt. Da die 6/94-RNA, die für das Klonierungsexperiment eingesetzt worden war, von Viren stammte, die in embryonalen Hühnerzellen vermehrt wurden, wäre eine solche Verunreinigung durch diese Kontrollhybridisierung nachzuweisen. Zelluläre DNA-Sequenzen könnten entweder beim Budding des Virus mit in die Virus-Hülle aufgenommen worden sein (vgl. Kapitel 1.2.1.) oder bei der Reinigung der Viruspartikel mitgeschleppt worden sein. In der Autoradiographie (Abb. 10 C) ist jedoch kein positives Hybridisierungssignal der DNA von Klon E (Spur 2) und W (Spur 3) mit zellulärer Hühner-DNA zu erkennen.

Die fünf Klone aus dem Experiment mit lambda 762 wurden auf dieselbe Weise im Southern Blot analysiert. Hierbei wurde festgestellt, daß nur einer dieser Klone - er wird C genannt - virusspezifische Sequenzen enthält. Das DNA-Insert von Klon C ist 1,4 kb groß (Abb. 11 A, Spur 1) und hybridisiert eindeutig mit der 6/94-RNA (Abb. 11 B, Spur 1). Die übrigen Klone zeigten kein positives Hybridisierungssignal mit der endmarkierten 6/94-RNA und wurden deshalb nicht weiter untersucht. Vermutlich enthalten diese Klone zelluläre DNA aus Hühnerfibroblasten, was bestätigen würde, daß die Präparation viraler RNA keine einheitliche, absolut virusspezifische Hybridisierungsprobe darstellt. Eine Klonierung bakterieller DNA kann ausgeschlossen werden, da im Ligierungsansatz keine E. coli DNA vorhanden war und somit keine Ligierung mit der Vektor-DNA stattfinden konnte. Die bakterielle DNA, die in den Verpackungsextrakten enthalten ist, wird bei der Herstellung der Extrakte mechanisch zerstört und kann nicht verpackt werden.



Abb. 11:

Charakterisierung der DNA von Klon C durch Hybridisierung mit ^{32}P -endmarkierter 6/94 ST-50S-RNA im Southern Blot.

Die DNA des Klons C wurde in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (A) angefärbt und anschließend auf einen Nitrozellulose-Filter übertragen. Dieser Filter wurde mit ^{32}P -endmarkierter 6/94 ST-50S-RNA hybridisiert und autoradiographiert (B).

Spur 1: 2 ug Klon C-DNA verdaut mit Hind III.

Spur 2: 2 ug Klon C-DNA verdaut mit Hind III und Eco RI.

Spur 3: 2 ug Klon C-DNA ungeschnitten.

Spur 4: Als Längenstandard 3 ug Hind III-verdaute lambda-DNA.

3.3.2. Northern Blot Analyse

Da zur Zeit dieser Experimente die Klonierung genomischer cDNA eines Negativ-Strang-Virus noch nicht beschrieben war und es sich somit um ein besonderes Ergebnis handelte, sollte zu dem beschriebenen Spezifitätsnachweis noch ein weiterer hinzugefügt werden. Theoretisch ist nämlich bei der Isolierung der 6/94-Virus-RNA eine Kontamination mit z.B. ribosomaler RNA möglich, die dann wie die virale RNA in komplementäre DNA transkribiert und kloniert werden könnte. Da diese ribosomale RNA außerdem die zur Identifizierung der Klone verwendete, endmarkierte Virus-RNA kontaminieren könnte, schloße sich der Kreis: Im Hybridisierungsexperiment ergäbe die markierte, ribosomale RNA mit der klonierten, ribosomalen cDNA ein positives Signal. Zwar sprach die Länge der Klon E-DNA von 6,9 kb gegen die Annahme klonierter, ribosomale cDNA, da die größte ribosomale RNA ca. 5 kb lang ist, es könnte sich aber um ein artifizielles Ligaseprodukt oder eine Synthesevorstufe ribosomaler RNA handeln. Deshalb sollte nachgewiesen werden, daß die klonierten cDNA-Fragmente mit der viralen 50S-RNA und nicht mit der ribosomalen RNA von 28S und 18S hybridisiert. In der Abbildung 12 ist das Ergebnis dieses Experiments am Beispiel der DNA des Klon E dargestellt: Virale 6/94-50S-RNA (Spur 2) und ribosomale RNA aus nicht-infizierten Zellen (Spur 1) wurde nach Denaturierung mit Glyoxal in einem Agarosegel aufgetrennt und auf "Gene Screen Plus" durch Elektroblot übertragen. Die denaturierenden Bedingungen sind notwendig, um Sekundärstrukturen aufzuheben und damit einen Größenvergleich der RNAs zu erlauben. Zur Hybridisierung wurde das mit ^{32}P -dCTP nicktranslatierte cDNA-Insert des Klon E eingesetzt, das zuvor über ein präparatives Agarosegel von den Vektor-Armen getrennt worden war. Die Hybridisierung der Klon E-DNA mit der viralen 50S-RNA ist deutlich positiv (Spur 2). Dagegen ist keine Hybridisierung mit der ribosomalen RNA erkennbar (Spur 1). Das Ergebnis läßt den Schluß zu, daß keine kontaminierenden, ribosomalen Sequenzen in der DNA des Klon E vorhanden sind. Ein entsprechendes

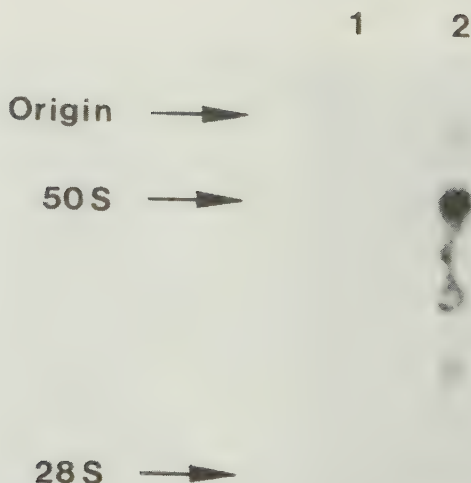


Abb. 12:

Northern Blot-Hybridisierung von 6/94 ST-50S-RNA mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon E-DNA.

15 μg ribosomale RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen als Negativkontrolle und S-Wert Marker (Spur 1) und 500 ng 6/94 ST-50S-RNA (Spur 2) wurde mit Glyoxal denaturiert und in einem 0,8% Agarosegel bei 20 V, 15 mA in 12 h elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die RNA auf "Gene Screen Plus" durch Elektrobplot übertragen. Der Filter wurde mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon E-DNA hybridisiert und autoradiographiert.

Ergebnis wurde auch für die Klone W und C erzielt.

3.3.3. Dot Blot Analyse

Die erhaltenen Klone E, W und C hatten noch eine wesentliche Anforderung zu erfüllen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine 6/94-virusspezifische Hybridisierungsprobe zu erhalten, mit der sich eine 6/94-Infektion von Zellen sicher nachweisen läßt. Deshalb war es nötig, die Nachweisbarkeit von 6/94-RNA aus infizierten Zellen mit Hilfe der klonierten cDNA zu testen. Könnte man zeigen, daß die klonierte DNA nur mit der RNA aus 6/94-infizierten Zellen, nicht aber mit der RNA aus nicht-infizierten Zellen hybridisiert, so wäre dadurch der stichhaltigste Spezifitätsnachweis erbracht.

Hierzu wurden zunächst 1×10^7 BSC-1-Zellen mit $3,2 \times 10^5$ KID 6/94 ST-Virus (MOI=0,03) infiziert und nach 48 h die cytoplasmatische RNA isoliert. Die Zellen zeigten in dieser akuten Infektionsphase schon leichte cytopathische Effekte, wie Riesenzellenbildung und teilweise Ablösung vom Boden der Kulturflasche. Eine Parallelkultur, die mit derselben Dosis infiziert worden war, zeigte nach 48 h 50% HAD-positive Zellen. Die cytoplasmatische RNA aus den 6/94 ST-infizierten und aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen wurde nun in einem Hybridisierungsexperiment mit ^{32}P -nicktranslatierter DNA des Klons W eingesetzt (Abb. 13, Spur 4 und 2). Als Positiv-Kontrolle wurde W-DNA (Spur 3), als Negativ-Kontrolle Gesamt-Nukleinsäure aus nicht-infizierten Zellen der Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnereis (Spur 1) eingesetzt. In diesen Zellen vermehrt sich das Virus bei der Züchtung in bebrüteten Hühnereiern und sie sind das einzige zelluläre Material, mit dem die Ausgangsviren vor der Klonierung in Berührung gekommen waren.

Die Nukleinsäure-Proben wurden nach Denaturierung mit Glyoxal (Kapitel 2.3.10.3.) in gleichem Volumen auf Nitrozellulose getropft, wobei zur Standardisierung mittels

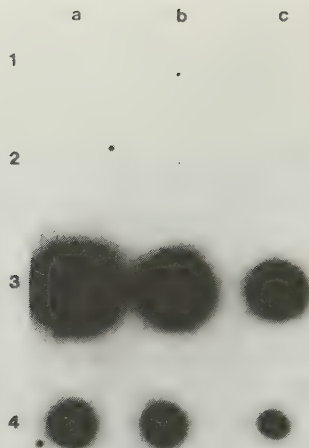


Abb. 13:

Dot Blot-Hybridisierung von cytoplasmatischer RNA aus 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen mit ^{32}P -nicktranslatierter DNA des Klons W.

Cytoplasmatische RNA aus nicht-infizierten (Spur 2) und 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen (Spur 4), Gesamt-Nukleinsäure aus nicht-infizierten Zellen der Chorioallantoismembran des Hühnereis als Negativkontrolle (Spur 1) und DNA des Klons W als Positivkontrolle (Spur 3) wurden mit Glyoxal denaturiert, in verschiedenen Verdünnungen auf einen Nitrozellulose-Filter getropft, mit ^{32}P -nicktranslatierter W-DNA hybridisiert und autoradiographiert.

Spur 1: 2 ug (a), 200 ng (b) und 20 ng (c)

Gesamt-Nukleinsäure aus nicht-infizierten Zellen der Chorioallantoismembran des Hühnereis.

Spur 2: 500 ng (a), 50 ng (b) und 5 ng (c)

cytoplasmatische RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen.

Spur 3: 5 ng (a), 500 pg (b) und 50 pg (c)

DNA des Klons W (nach dem Abtrennen der Vektorarme).

Spur 4: 500 ng (a), 50 ng (b) und 5 ng (c)

cytoplasmatische RNA aus 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen (MOI=0,03).

einer Absaugapparatur eine Konzentrierung auf eine kleine Fläche von rund 3 mm Durchmesser erreicht wurde (Dot Blot; Kapitel 2.3.21.1.). Die klonierte cDNA hybridisierte nur mit der RNA aus den 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen, aber weder mit der RNA aus den nicht-infizierten BSC-1-Zellen, noch mit der aus nicht-infizierten CAM-Zellen. Das selbe Ergebnis wurde auch mit der DNA von Klon E und C erhalten.

Es konnte in einem weiteren Dot-Blot-Experiment gezeigt werden, daß die 6/94-cDNA-Fragmente der Klone E und W nicht miteinander hybridisierten und folglich unterschiedliche Genombereiche repräsentieren. Die eluierten 6/94-cDNA-Fragmente aus Klon W und C hybridisierten jedoch miteinander, sie müssen also mindestens überlappen.

3.3.4. Zwischenzusammenfassung

Aus 50 ng 6/94-cDNA wurden mit dem Vektor 728 die beiden virusspezifischen Klone E und W, mit dem Vektor 762 der 6/94-Klon C erhalten. Durch die im Kapitel 3.3. dargestellten Ergebnisse ist eindeutig erwiesen, daß diese Klone absolut 6/94-virusspezifisch sind und zum stichhaltigen Nachweis einer Infektion von Zellen mit 6/94-Viren geeignet sind. Hiermit existierten die ersten Klone genomischer Paramyxovirus-RNA. Nimmt man das vollständige 6/94-Genom mit 15 kb an (Kolakofsky et al. 1974), so repräsentieren der Klon E mit 6,9 kb 45% und die Klone W und C mit 1,3 bzw. 1,4 kb etwa 9% der vollen Genomlänge. Da die Klone W und C keine mit dem Klon E identischen Bereiche aufzuweisen scheinen, erhöht sich der klonierte Anteil am Gesamt-Genom auf über 50%. Mit 6,9 kb war außerdem die bisher längste cDNA eines RNA-Virus kloniert worden.

3.4. Zuordnung der Klone zu den viralen Genen

Nachdem die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Klonierung von 6/94-cDNA-Fragmenten erfolgreich durchgeführt worden war, veröffentlichten Shioda und Mitarbeiter (1983)

3687 Nukleotide, die vom 3'-Ende des Sendai-Genoms beginnend, die Leader-Sequenz und die Strukturgene NP und P, sowie das Nicht-Strukturgen C einschließen. Damit war etwa 1/4 des Sendai-Genoms bekannt. In den folgenden Kapiteln wird nun der Frage nachgegangen, ob die 6/94-cDNA-Klone diesen oder anderen Genen zuzuordnen sind.

3.4.1. Restriktionsanalyse der 6/94-cDNA-Inserts

Mit Hilfe eines Computerprogramms läßt sich aus der von Shioda et al. (1983) ermittelten Nukleotidsequenz eine Restriktionskarte vom 3'-Ende des Sendai-Genoms aufstellen. Die Restriktionsanalyse der klonierten 6/94-cDNA und ein Vergleich mit der für Sendai erstellten Restriktionskarte sollte Hinweise auf eine Verwandtschaft mit den beschriebenen Sendai-Genen und somit eine Zuordnung der 6/94-Klone zu bestimmten, viralen Genen ermöglichen.

Die Restriktionsanalyse der eluierten 6/94 cDNA-Inserts von Klon E, W und C, die durch Abtrennen der lambda-Vektorarme (Kapitel 2.3.16.) erhalten wurden, erwies sich als schwierig. Ein Hindernis war die geringe Ausbeute an 6/94-Insert-DNA bedingt durch die schlechte Vermehrung der lambda-Phagen. Möglicherweise behindern Expressionsprodukte der viralen Sequenzen die Vermehrung des Phagen. Es wurden insgesamt aus 1 l Phagenlysats nur durchschnittlich 100 µg DNA erhalten. Außerdem beträgt, in Bezug auf die Gesamtlänge der Vektor-DNA mit 38,6 kb, der Anteil des E-Inserts mit 6,9 kb nur etwa 18%, d.h. 18 µg, derjenige der Fragmente W und C nur etwa 4%, d.h. 4 µg. Für die Suche nach Restriktionsenzymen, die die klonierte DNA schneiden, stand also nicht viel Material zur Verfügung.

Es wurden zunächst Enzyme ausgewählt, die im Genom der verwandten Sendai-Viren Erkennungsstellen besitzen (Shioda et al. 1983). Die Tabelle 6 faßt zusammen, welche Enzyme getestet wurden und ob sie in der jeweiligen klonierten DNA schneiden konnten. In Abbildung 14 sind die entstandenen Re-

Tabelle 6:Restriktions-Schnittstellen der
klonierten 6/94-cDNA-Fragmente

	E	W	C
Hae III	viele	≥2	≥3
Taq I	-	2	>1
Ava II	≥3	0	0
Kpn I	0	0	0
Eco RI	0	0	0
Pst I	1	0	0
Hind III	0	0	0
Bgl II	0	0	0

Tabelle 7:

Vergleich der Restriktionsfragmente der klonierten Region
der Gene NP, P und C des Sendaivirus-Genoms
(Shioda et al. 1983) mit denen der 6/94-Klone

Doppelverdau
 Ava I - Hind III
 Sendai 6/94 E

505	4300
20	1500
477	
68	
351	
597	→600
455	
74	
39	
129	
465	
97	
410	

Doppelverdau
 Hae III - Hind III
 Sendai 6/94 W 6/94 C

123	→100
85	
452	→480
329	→325
37	
447	
138	
153	
406	
565	→560
213	
392	
334	→340

Die Restriktionfragmente des Sendaivirus-Genoms sind entsprechend der Restriktionskarte angeordnet. Man findet zwar in der klonierten 6/94-cDNA Fragmente vergleichbarer Größe (angedeutet durch Pfeile), z.B. bei 480 und 560 6/94 W, aber nicht benachbart, so daß die Fragmente als zufällig gleichgroß angesehen werden müssen.-

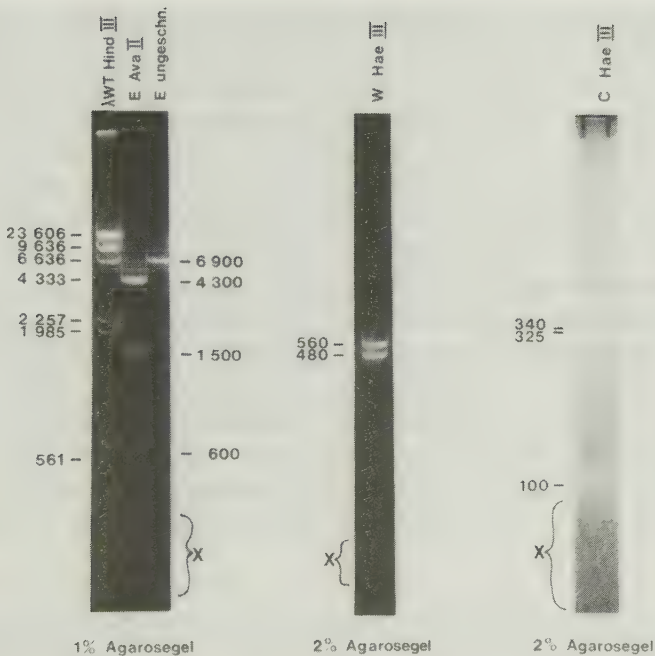


Abb. 14:

Restriktionsanalyse der klonierten 6/94-cDNA C, W und E.

Die 6/94-cDNA-Inserts E, W und C wurden nach Restriktion mit Hind III (Kapitel 2.3.12.) durch Elution aus einem präparativen 0,8% Agarosegel von den lambda-Vektorarmen getrennt (Kapitel 2.3.16.). Jeweils 1 µg klonierte 6/94-cDNA wurden dann mit dem angegebenen Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 2.3.12.) und die entstandenen Fragmente im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurden 2,5 µg lambda-DNA eingesetzt, die mit Hind III verdaut worden waren. Die Größe der mit X bezeichneten Restriktionsfragmente ist nicht bekannt.

striktionsfragmente einiger Analysen nach Auftrennung im Agarosegel dargestellt. Der Vergleich mit den Sendaivirus-Fragmenten (Tabelle 7) ergibt, daß zwar in der klonierten 6/94-cDNA einige vergleichbare Fragmente gefunden werden, die aber nicht direkt benachbart liegen und deshalb als zufällig gleich groß angesehen werden müssen.

Das läßt vermuten, daß entweder das 6/94-Genom vom Sendaivirus-Genom differiert oder aber ein anderer Bereich des Genoms kloniert wurde. Da nur die ersten 3,6 kb vom 3'-Ende des Genoms veröffentlicht sind (Shioda et al. 1983), ist das sehr wahrscheinlich. Die Anordnung der in Abbildung 14 dargestellten Restriktionsfragmente der 6/94-Klone E, W und C konnte nach Endmarkierung der Hind III-Enden, die zur DNA-Sequenzierung nötig war, ermittelt werden und ist in Abbildung 18 gezeigt. Eine ausführliche Analyse von Teilen der klonierten cDNA wurde durch DNA-Sequenzierung und mit Hilfe eines Computerprogramms möglich und wird im Kapitel 3.4.3. vorgestellt.

3.4.2. Hybridisierung der klonierten 6/94-cDNA mit viraler mRNA

Eine weitere Möglichkeit, die 6/94-cDNA-Klone bestimmten Genom-Bereichen zuzuordnen, ist durch Hybridisierung mit den viralen 6/94-mRNAs gegeben.

Vom 6/94-Polypeptidmuster ausgehend, sind sechs verschiedene mRNAs zu erwarten. Die mRNAs des 6/94-Virus wurden bisher noch nicht beschrieben. Ihre Auftrennung im denaturierenden Gel war deshalb die Voraussetzung für eine Zuordnung der viralen cDNA-Klone zu bestimmten mRNA-Banden durch Hybridisierung im Northern Blot.

Da das 6/94-Virus sich in Zellkultur wesentlich schlechter als im bebrüteten Hühnerei vermehren läßt, wurden, um eine ausreichende Ausbeute an viraler mRNA zu erhalten, BSC-1-Zellen mit der hohen MOI = 2 mit

6/94 ST-Virus infiziert. Diese hohe MOI ist nur zu erreichen, wenn man vor Infektion virushaltige Allantoisflüssigkeit stark konzentriert. Es müssen etwa 300 bis 400 ml Allantoisflüssigkeit auf ein Volumen von 5 ml eingengt werden, um 1×10^7 Zellen in einer T 175 Roux-Kulturflasche mit $MOI = 2$ infizieren zu können. Um die zelluläre Transkription zu hemmen und damit den relativen Anteil an viraler mRNA zu erhöhen, wurden 6 h nach Infektion 40 μ g Aktinomycin D pro 1×10^7 Zellen zugesetzt. Aktinomycin D hemmt nur die Synthese von RNA an einem DNA-Template und damit nicht die virale mRNA-Synthese, die von einer RNA-Matrize ausgeht. Der Anteil an mRNA gegenüber der gesamten, zellulären RNA beträgt circa 5%, wovon nur ein kleiner Teil virale mRNA sein kann. Das bedeutet, daß nur mit sehr niedrigen Ausbeuten an 6/94-mRNA zu rechnen ist. Aus 1×10^7 Zellen konnten durchschnittlich 100 μ g Gesamt-RNA und 5 μ g Gesamt-mRNA isoliert werden, wovon sicher weniger als 1 μ g an viraler mRNA zu erwarten ist.

Die RNA wurde deshalb 7 h nach Infektion in vivo mit 500 μ Ci 3 H-Uridin pro 1×10^7 Zellen markiert. Nach 22 h wurde die Gesamt-RNA mit der Guanidinium-Rhodanid-Methode (nach Chirgwin et al. 1979; Kapitel 2.3.8.1.) isoliert und die Höhe der Markierung in 1×10^7 Zellen auf insgesamt 1×10^6 cpm bestimmt. Die mRNA mit ihrer terminalen Poly(A)-Kette wurde über eine Oligo(dT)-Zellulose-Säule isoliert und in einem analytischen Gel aufgetrennt. Abbildung 15 zeigt die markierte mRNA nach Elution von der Oligo(dT)-Säule und nach Auftrennung in einem denaturierenden Agarose-Harnstoffgel (Spur 2).

In Übereinstimmung mit publizierten Daten für Sendai-mRNA liegen die erhaltenen 6/94-mRNAs gemessen an der 3 H-markierten 18S ribosomalen RNA (Spur 1) im Bereich von 18S (Gupta und Kingsbury 1982; Gupta et al. 1983). Von den sechs zu erwarteten mRNA-Banden sind aber nur drei erkennbar. Entsprechend der Angaben in der Literatur (Gupta und Kingsbury 1982; Gupta et al. 1983) wurden die obere

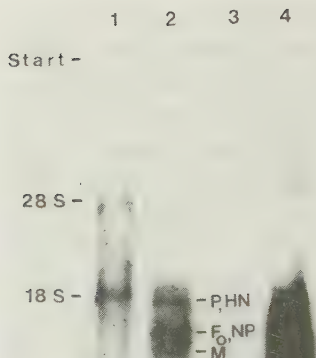


Abb. 15:

Analyse von ^3H -markierter 6/94-mRNA im Harnstoffgel. BSC-1-Zellen wurden mit 6/94 ST-Virus ($\text{MOI}=2$) infiziert, die RNA in vivo mit 500 uCi ^3H -Uridin pro 1×10^7 Zellen markiert und die Kulturen unter Zusatz von 40 ug Aktinomycin D pro 1×10^7 Zellen für 24 h bei 33°C inkubiert. Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus den infizierten Zellen wurde die mRNA von der nicht-Poly(A)-haltigen RNA über eine Oligo(dT)-ZelluloseSäule abgetrennt und in einem 1,5% Agarosegel mit 6 M Harnstoff elektrophoretisch aufgerennt. Zur Verstärkung der Autoradiographie wurde das Gel wie bei Abb. 6 beschrieben, fluorographiert und 4 Tage exponiert.

Spur 1: ^3H -markierte ribosomale RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen. 1×10^7 Zellen wurden mit 500 uCi ^3H -Uridin 10 Tage bei 37°C inkubiert und die cytoplasmatische RNA isoliert.

Es wurden etwa 1×10^5 cpm aufgetragen.

Spur 2: ^3H -markierte, virale mRNA aus 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen unter Aktinomycin D und nach Abtrennung über eine Oligo(dT)-Zellulose-Säule. Es wurden 1×10^5 cpm aufgetragen.

Spur 3: Leerspür.

Spur 4: ^3H -markierte, nicht-Poly(A)-haltige RNA aus 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen unter Aktinomycin D. Es handelt sich hierbei um das von der Oligo(dT)-Säule nicht gebundene RNA-Material.

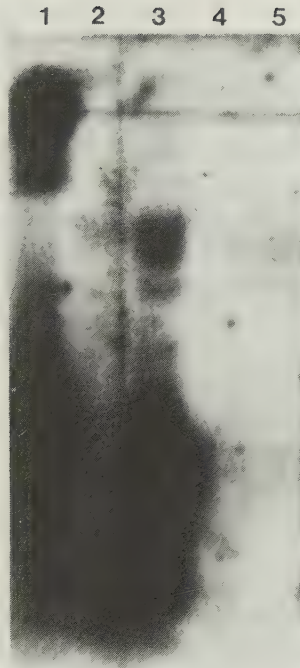


Abb. 16:

Northern Blot-Hybridisierung von 6/94 ST-mRNA mit 32 P-picktranslatierter Klon W-DNA.

1×10^6 BSC-1-Zellen wurden mit 6/94 ST-Virus (MOI=2) infiziert und bei 33°C mit $100 \mu\text{g}$ Aktinomycin D pro 1×10^6 Zellen 19 h inkubiert. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurde die mRNA über eine Oligo(dT)-Zellulose-Säule abgetrennt. Als Positivkontrolle und Längenstandard wurde Gesamt-RNA aus 6/94 ST-Viruspartikeln eingesetzt, die aus der Allantoisflüssigkeit infizierter, bebrüteter Hühnereier isoliert worden waren. Als Negativkontrolle diente ribosomale RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen. Die RNA-Proben wurden mit Glyoxal denaturiert und in verschiedenen Verdünnungen in einem 1,5% Agarosegel bei 20 mA, 100 V in 6 h elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf "Gene Screen Plus" erfolgte durch Elektroblood. Der Filter wurde mit 32 P-picktranslatierter DNA des Klons W hybridisiert und autoradiographiert.

Spur 1: $1 \mu\text{g}$ 6/94 ST-RNA.

Spur 2: mRNA aus 1×10^6 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen.

Spur 3: mRNA aus $8,8 \times 10^6$ 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen.

Spur 4: 5 μg ribosomale RNA nicht-infizierter BSC-1-Zellen.

Spur 5: mRNA aus 1×10^6 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen.

Bande als Doppelbande der mRNA des P- und HN-Proteins, die mittlere Doppelbande der F_O- und NP-mRNA und die unterste Bande der mRNA des M-Proteins zugeordnet. Man geht davon aus, daß die mRNAs der Genprodukte P und HN, bzw. F und NP nahezu gleich lang sind, sodaß sie nicht in einzelne Banden aufgetrennt werden können. Die mRNA des Proteins L ist in der Abbildung 15 (Spur 3) nicht erkennbar. Dies ist insofern zu erwarten, als erfahrungsgemäß auch in Proteinpräparationen das L-Genprodukt sehr stark unterrepräsentiert ist (Glazier et al. 1977; Neubert, Fey, mündliche Mitteilung). Ein bessere Auftrennung der mRNA als die in Abbildung 15 gezeigte, war weder durch Variation der Agarosekonzentration, noch mit anderen denaturierenden Komponenten zu erreichen, wie z.B. mit Formaldehyd, Glyoxal und Quecksilberhydroxid.

Zur Zuordnung der klonierten cDNA durch Hybridisierung im Northern Blot müssen die mRNAs transferierbar sein. Harnstoffgele, welche nach eigenen Erfahrungen die beste Trenneigenschaft für virale mRNAs besitzen, haben den Nachteil, daß die RNA nicht auf Filtermembranen transferiert werden kann, was für die Hybridisierung Voraussetzung ist. Diese Erkenntnis wurde durch eigene Versuche gewonnen. Hierzu wurde der Transfer von 6/94 ST-RNA aus Harnstoffgelen auf Nitrozellulose durch Hybridisierung mit ³²P-endmarkierter 6/94 ST-RNA überprüft. Da keine Hybridisierungssignale erkennbar waren, muß angenommen werden, daß die RNA nicht an das Filter gebunden wurde.

RNA, die mit Glyoxal denaturiert worden war, ließ sich vom Glyoxalgel zwar gut auf Filtermembranen übertragen, aber die RNA-Proben einschließlich der ribosomalen Marker-RNA waren im Glyoxalgel mit Ethidiumbromid ebenso wie mit Akridin-Orange sehr schlecht anfärbbar. Nach Behandlung mit Ethidiumbromid und Akridin-Orange läßt sich die RNA außerdem nicht mehr effizient transferieren (Dr. Peter Müller, MPI für Biochemie, Martinsried, persönliche Mitteilung). Da im Harnstoffgel (Abb. 15) die 6/94 ST-mRNAs hinsichtlich ihrer

Größe bereits analysiert worden waren, wurde nun nicht-markierte 6/94-mRNA im Glyoxalgel (Kapitel 2.3.10.2.1.) aufgetrennt, ohne Färbung auf Nitrozellulose übertragen und mit ^{32}P -nicktranslatierter DNA des Klon W hybridisiert (Abb. 16). Als Positiv-Kontrolle und Längenstandard wurde in Spur 1 6/94 ST-RNA eingesetzt, als Negativ-Kontrolle ribosomale RNA aus nicht-infizierten Zellen (Spur 4). Die Spuren 2, 3 und 5 zeigen über Oligo(dT)-Zellulose gereinigte, virale mRNA in unterschiedlichen Verdünnungen. Unerwarteterweise ist in Spur 3 die Hybridisierung der viralen cDNA mit allen drei mRNA-Banden erkennbar. Da dieser Klon mit einer Länge von 1,3 kb nicht drei mRNA-Spezies repräsentieren kann, liegt es nahe, daß die W-DNA Sequenzen enthält, die in mehreren Genombereichen vorkommen. Ein entsprechendes Ergebnis wurde auch mit Klon E und C erzielt.

Für Sendaivirus wurde beschrieben (Shioda et al. 1983), daß vor jedem Gen die gleiche Nukleotidsequenz von 9 Basen liegt, die als R1-Sequenz bezeichnet wird und eine Promotorfunktion haben könnte. Nach jedem Gen befindet sich die ebenfalls konservierte R2-Sequenz von 11 Basen, bei der es sich vermutlich um das Polyadenylierungssignal handeln könnte (Gupta und Kingsbury 1984). Enthält die klonierte 6/94-cDNA solche Sequenzen, so ist eine Hybridisierung mit mehreren mRNA-Banden erklärbar.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die eindeutige Zuordnung der klonierten 6/94-cDNA über die Hybridisierung mit den viralen mRNAs nicht zu erreichen ist. Erstens kann die mRNA nicht in die zu erwartenden sechs Banden aufgetrennt werden, und zweitens hybridisiert die klonierte cDNA mit der mRNA verschiedener 6/94-Genprodukte. Es mußte deshalb ein anderes Verfahren angewendet werden.

3.4.3. Sequenzanalyse der klonierten 6/94-cDNA

Die Zuordnung der klonierten 6/94-cDNA zu bestimmten Genen wurde nun durch Sequenzvergleiche mit bereits veröffentlichten Nukleotidsequenzen von Sendai-Viren versucht.

6/94-Klone, deren Sequenzen vom 3'-Ende des viralen Genoms stammen, sind auf Grund der Klonierungsstrategie mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zu erwarten, da mit Oligo(dT) als Primer die cDNA-Synthese am polyadenylierten 3'-Ende des viralen Genoms startet (Kapitel 3.2.1.). Bereits die Restriktionsanalyse (Kapitel 3.4.1.) lieferte aber Hinweise, daß die 6/94-Klone nicht aus dem von Shioda et al. (1983) sequenzierten 3'-orientierten Bereich des Genoms stammen. Dieses sollte nun durch Sequenzvergleiche von 6/94-cDNA und Sendai-RNA überprüft werden.

Neben 3'-terminalen Sequenzen könnten auch mittlere und 5'-orientierte Bereiche des Genoms in den 6/94-cDNA-Klonen repräsentiert sein, wenn man davon ausgeht, daß ursprünglich eine 6/94-cDNA voller Genomlänge synthetisiert und nach Hind III-Restriktion nur in Form der entsprechenden Fragmente kloniert worden ist. Das bedeutet, daß auch Sequenzen der Gene M, F^O, HN oder L kloniert worden sein könnten. Eine Möglichkeit, die 6/94-Klone diesen Genen zuzuordnen, ist durch zwei weitere, neue Arbeiten gegeben, in denen die zwischen den Sendai-Genen liegenden Bereiche und die mRNA-Startsignale (Gupta und Kingsbury 1984), sowie das Ende des L-Gens (Re et al. 1983 b) sequenziert wurden. Damit sind Anfang und Ende jedes Gens auf dem Sendai-Genom bekannt.

Es soll nun durch Sequenzieren von Teilen der klonierten 6/94-cDNA nach einer Übereinstimmung mit allen bisher publizierten Sendai-Sequenzen gesucht werden.

Für die DNA-Sequenzierung wurden die cDNA-Fragmente E, W

und C in die Hind III-Schnittstelle des Plasmids pBR327 (Soberon et al. 1980) rekloniert, wie im Kapitel 2.3.19. beschrieben wurde. Die Verwendung von Plasmiden hat den Vorteil, daß die Ausbeute an DNA bedeutend größer ist. Aus einem Liter plasmidhaltiger Bakterienkultur konnte bis zu 1 mg Plasmid-DNA isoliert werden, ein Liter Phagen-Lysat erbrachte dagegen nur 100 bis 200 µg DNA. Da pBR327 mit 3,3 kb um ein vielfaches kleiner ist als die Vektor-DNA der lambda-Phagen, erhöht sich auch der relative Anteil an Insert erheblich.

Es wurden mit den Insert-DNAs E, W und C Tetracyclin-sensitive Plasmidklone erhalten, von denen insgesamt 12 Klone weiter untersucht wurden. Die Plasmid-DNA wurde zunächst nach der im Kapitel 2.3.15.1. beschriebenen, schnellen Präparationsmethode isoliert. Abbildung 17 zeigt die cDNA-Fragmente E (Spuren 8-13), W (Spuren 3-7) und C (Spur 2) nach dem Reklonieren in pBR 327 (Spur 1) und Restriktionsverdau mit Hind III. Für die weiteren Experimente wurden die Plasmidklone C (Spur 2), W (Spur 4) und E (Spur 8) ausgewählt.

Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA in größeren Mengen isoliert (Kapitel 2.3.15.) und mit Hind III verdaut. Die 6/94-cDNA-Inserts E, W und C wurden anschließend aus einem präparativen 1% Agarosegel. eluiert und am Hind III-Ende unter Verwendung von gamma-³²P-ATP und Polynukleotidkinase endmarkiert. Nach dieser Markierung der 5'-Enden wurden die Hind III-Fragmente unterschiedlich nachgeschnitten: Klon E-DNA mit Ava II, Klon W- und C-DNA mit Hae III (Abb. 14). Die so entstandenen Subfragmente der 6/94-Sequenzen waren nur noch an einem Ende markiert und wurden nach Elution aus einem präparativen Gel nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) sequenziert.

Vom Insert W konnten von den markierten Enden der 480 bp und 560 bp großen Subfragmente nach Hae III-Schnitt (vgl. Abb. 14) jeweils 324 Nukleotide gelesen werden. Im Falle der



Abb. 17:

Die 6/94-cDNA-Fragmente nach dem Reklonieren in pBR327.

Die 6/94-cDNA-Inserts der Klonen E, W und C wurden in die Hind III-Schnittstelle des Plasmids pBR327 rekloniert. Die Abbildung zeigt 12 der erhaltenen Tetracyclin-sensitiven Klone, deren Plasmid-DNA nach der im Kapitel 2.3.15.1. beschriebenen Methode isoliert, mit Hind III verdaut und in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt worden war.

Spur 1: lüg pBR327 verdaut mit Hind III.

Spur 2: 500 ng Klon C-DNA verdaut mit Hind III.

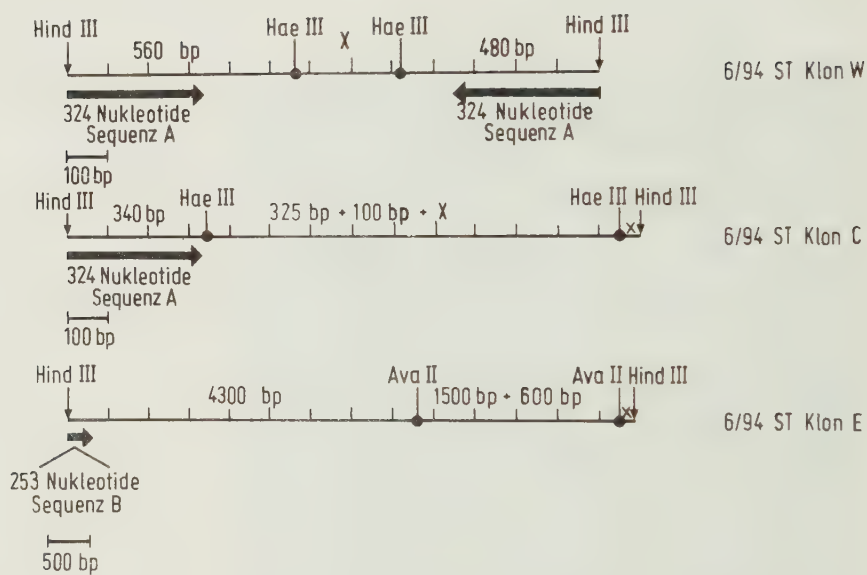
Spur 3-7: 500 ng Klon W-DNA verdaut mit Hind III.

Spur 8-13: 500 ng Klon E-DNA verdaut mit Hind III.

E-DNA entstanden durch das Restriktionsenzym Ava II zwei Fragmente sehr unterschiedlicher Größe. Markiert worden waren ein 4300 bp großes Subfragment und ein sehr kleines, nur wenige bp langes Fragment (vgl. Abb. 14). Aus der Klon C-DNA entstanden nach Verdau mit Hae III ein 340 bp langes, markiertes Fragment und wie im Falle von E ein sehr kleines, markiertes Fragment (vgl. Abb. 14). Von der E- und C-DNA wurden zunächst nur die beiden größeren Fragmente sequenziert, da sich die kleineren schwer isolieren lassen und außerdem wegen ihrer geringen Länge für die Sequenzierung nicht lohnend sind. Die ermittelten Nukleotidsequenzen sind für alle drei 6/94-cDNA-Klone in der Abbildung 18 vorgestellt.

Das Ergebnis der Sequenzanalyse war in verschiedener Hinsicht überraschend. Erstens sind die beiden Enden der W-DNA (bisher sequenziert 324 Nukleotide) absolut identisch. Die Sequenzen an den Enden der Klon W-DNA stellen also einen "inverted repeat" dar. Zweitens zeigt sich eine völlige Übereinstimmung der bisher sequenzierten Bereiche von W- und C-DNA. Beide Klone enthalten also zumindest identische Anfangssequenzen (Abb. 18).

Mit Hilfe von Computerprogrammen konnten von den bisher bekannten 6/94-Sequenzen der W-, C- und E-DNA detaillierte Analysen durchgeführt werden. Das Ergebnis dieser Auswertungen ist aus Abbildung 19 ersichtlich. In den Abbildungen 19 a und b sind die Restriktionskarten für die bisher sequenzierten Bereiche der Klone E, W und C dargestellt. In einer weiteren Computeranalyse der sequenzierten Bereiche wurden mögliche Leserahmen für hypothetische Proteine festgestellt (Abb. 19 c). Es sei vor allem darauf hingewiesen, daß der sequenzierte Bereich des Klons E ein virales Gen enthalten muß, da in beiden Richtungen Leserahmen vorhanden sind, die für Proteine einer Größe von mindestens 70 bzw. 84 Aminosäuren kodieren. Im Falle der Klone W und C liegt etwa am Anfang der ermittelten Sequenz ein Startkodons ATG, von dem ein offener Leserahmen



A

1- 50 GCTTGCATAG GTCATGGATG GGCAGGAGTC CTCCCAAAAC CCTTCTGACA
 51-100 TACTCTATCC AGAATGCCAC CTGAACTCTC CCATAGTCAG GGGGAAGATA
 101-150 GCACAGTTGC ACGTCTTGTT AGATGTGAAC CAGCCCTACA GACTAAAGGA
 151-200 CGACAGCATA ATAAATATTA CAAAGCACAA AATTAGGAAC GGAGGATTGT
 201-250 CCCCTCGTCA AATTAAGATC AGGTCTCTGG GTAAGGCTCT TCAACGCACA
 251-300 ATAAAGGATT TAGACCGATA CACCTTTGAA CCGTACCCAA CCTACTCTCA
 301-324 GGAATTACTT AGGCTTGATA TACC

B

1- 50 CTTGTTTTTC CTGCGGGAGA ACGACTGCCA GGATTCAGGA ATATACAGCG
 51-100 ACGAAGGCTG ACGTGGATCG AAGGGAATCG CCCCAGCCAT CACCGGATTT
 101-150 TTGATGCCCT GCGCTTTGGC ATCGGCAAAC AGCGCGGCGA GTTTTTGCTG
 151-200 AAAGGAAGCTG TCGGGCGAAT CCCC GTTCAC AGCCGGTTCA TCGAAGCGGG
 201-250 CGAAACATCC TGACGTCGTA AAAGTGGGT ACGGCGATAA AGAAAAAGCG
 251-253 ATT

Abb. 18:

Anfangssequenz der Klone W, C und E.

Die 6/94-cDNA-Inserts der Klone E, W und C wurden an den Hind III-Enden mit gamma-³²P-ATP 5'markiert. Die Klon E-DNA wurde anschließend mit Ava II, die Klon W- und Klon C-DNA mit Hae III nachgeschnitten und nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) von Frl. Christine Schmidt sequenziert. Von der 6/94-cDNA aus Klon W und C konnte eine identische Anfangssequenz von 324 Nukleotiden (A), von der 6/94-cDNA aus Klon E 253 Nukleotide (B) gelesen werden. Die Größe der mit X bezeichneten Restriktionsfragmente ist nicht genau bekannt.

Enzyme	No. Cuts	1	40	80	120	160	200	253
Aat II	1.							1
Acy I	1.							1
Aha II	1.							1
Aor I	1.		1					
Aos II	1.							1
Apy I	1.		1					
Aatw I	1.							1
Asu III	1.							1
Atu II	1.		1					
Bin I	1.			1				
Bst I*	1.							
Bstn I	1.		1					
Cfo I	2.				1	1		
Cpf I	1.			1				
Dpn I	1.			1				
EcoR I*	3.		1		1		1	
EcoR II	1.		1					
Fnu4H I	1.					1		
FnuA I	3.		1	1			1	
FnuC I	1.			1				
FnuD II	1.				1			
FnuD III	2.				1	1		
FnuE I	1.			1				
Fok I	1.						1	
Hap II	2.				1		1	
HgiD I	1.							1
HgiG I	1.							1
HgiH I	1.							1
HgiH II	1.							1
Hha I	2.				1	1		
HinF I	3.		1	1			1	
HinPI I	2.				1	1		
Hpa II	2.				1		1	
Hph I	1.			1				
Mae II	2.			1				1
Mbo I	1.			1				
Mno I	2.				1		1	
Msp I	2.				1			
Nci I	1.		1				1	
Nde II	1.			1				
NapB I	1.							
Rru II	1.		1			1		
Rea I	1.							1
Sau3A I	1.			1				
SciI I	2.				1	1		
ScrF I	1.		1					
SfaN I	2.				1	1		
Taq I	2.			1			1	
TaqK I	1.		1					
Tba I	1.					1		
Tth MB 8	2.			1			1	
TthIII II	1.					1		

52 enzymes found

Abb. 19a:

Restriktionskarte des sequenzierten Bereichs von Klon E.

Die Restriktionskarte wurde mit Hilfe des Computerprogramms FORTRAN-77 NAQ von den ermittelten 253 Nukleotiden Anfangssequenz der Klon E-DNA, beginnend mit dem Hind III-Ende, erstellt.

Enzyme	No. Cuts	1	50	100	150	200	250	324
Bst I*	1.						1	
Cpf I	1.						1	
Dde I	2.						1	2
Dpn I	1.						1	
EcoR I*	1.							
EcoR I*	3.						1	
FnuA I	1.	1				1		1
FnuC I	1.					1		
FnuE I	1.					1		
Fok I	1.	1						
HinF I	1.	1						
Mae II	1.			1				
Mbo I	1.						1	
Mbo II	2.			1			1	
Mnl I	2.	1				1		
Nde II	1.					1		
Nla III	1.	1						
Rsa I	1.							1
Sau3A I	1.						1	
19 enzymes found								

Abb. 19b:

Restriktionskarte des sequenzierten Bereichs von Klon W und C.

Die Restriktionskarte wurde wie bei Abb. 19a erstellt. Sie umfaßt die ersten 324 Nukleotide beginnend mit dem Hind III-Ende der klonierten 6/94-cDNA.

6/94-cDNA E

```

1      32      63      95      127      158      190      221      253
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Carboxyl end of hypothetical protein A-70
+-----+
Hypothetical protein E-84 (fragment)
+-----+
Carboxyl end of hypothetical protein C-33
+-----+
Carboxyl end of hypothetical protein F-24
Carboxyl end of hypothetical protein D-21
+-----+

```

6/94-cDNA W,C

```

1      41      81      122      162      203      243      284      324
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Carboxyl end of hypothetical protein C-23
+-----+
Amino end of hypothetical protein B-103
+-----+
Hypothetical protein A-40
+-----+

```

Abb. 19c:

Leserahmen für hypothetische Proteine im sequenzierten Bereich der klonierten 6/94-cDNA von Klon E, W und C. Durch Computeranalyse mit dem Computerprogramm FORTRAN-77 NAQ konnten die möglichen Leserahmen für hypothetische Proteine über 20 Aminosäuren im sequenzierten Bereich der 6/94-cDNA-Klone E, W und C ermittelt werden.

ausgeht, der durch die ganze bisher bekannte Sequenz von 324 Nukleotiden reicht.

Mit einem weiteren Computerprogramm wurden nun Sequenzvergleiche der 6/94-cDNA mit sämtlichen publizierten Sendaivirus-Nukleotidsequenzen durchgeführt. Die Anordnung der Gene auf dem Sendai-Genom und die davon inzwischen bekannten Sequenzbereiche sind zur Übersicht in der Abbildung 20 dargestellt.

Ein Vergleich der von Gupta und Kingsbury (1984) ermittelten Anfangssequenzen der sechs Sendai-Gene mit den in dieser Arbeit erhaltenen 6/94-Sequenzen ergab, daß die für das L-Gen veröffentlichte Startsequenz von 129 Nukleotiden bis auf zwei Basen mit der bisher ermittelten Anfangssequenz der 6/94-Klone W und C übereinstimmt (Abb. 21). Mit allen weiteren publizierten Sendaivirus-Sequenzen konnte keinerlei Homologie festgestellt werden. Die Klone W und C sind somit eindeutig dem L-Gen zuzuordnen. Ihre Lage bezüglich des Sendai-Genoms ist in Abbildung 20 ersichtlich. Eine eindeutige Zuordnung des E-Klons zu bestimmten Genombereichen war mit den bisher bekannten Sequenzen nicht möglich. Da zum Teil nur die Startsequenzen der Gene bekannt sind, und der sequenzierte Bereich des Klons E vom Leserahmen her zu schließen innerhalb eines Gens liegen müßte, ist das verständlich.

3.4.4. Zwischenzusammenfassung

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Frage nachgegangen, welchen Genombereichen die Klone E, W und C zuzuordnen sind. Die Restriktionsanalyse der Klone E, W und C lieferte im Vergleich mit den von Shioda et al. (1983) publizierten Sendai-Sequenzen erste Hinweise darauf, daß die klonierten 6/94-cDNA-Fragmente nicht vom 3'-Ende des viralen Genoms stammen. Eine eindeutige Zuordnung durch Hybridisierung mit den viralen mRNAs war nicht zu erreichen, da die klonierte cDNA mit mehreren 6/94-mRNA-Species positive Hybridisie-

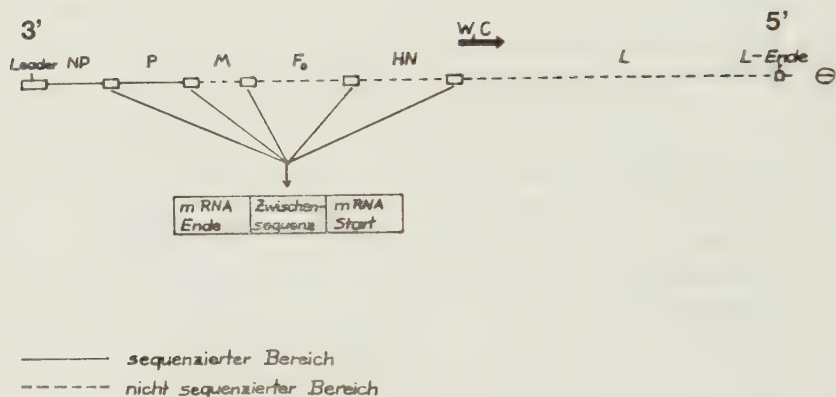


Abb. 20:

Zuordnung der Klone W und C zum Sendai-Genom.

Die Abbildung zeigt die Anordnung der Gene auf der genomischen Negativ-Strang-RNA des Sendaivirus (Gupta und Kingsbury 1984). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die bereits sequenzierten Bereiche (Shioda et al. 1983; Gupta et al. 1983; Gupta und Kingsbury 1984). Die gestrichelten Linien umfassen den bisher noch unbekannten Bereich des Sendai-Genoms. Die 6/94-cDNA-Klone W und C konnten durch Sequenzvergleich dem 3'-Ende des L-Gens zugeordnet werden.

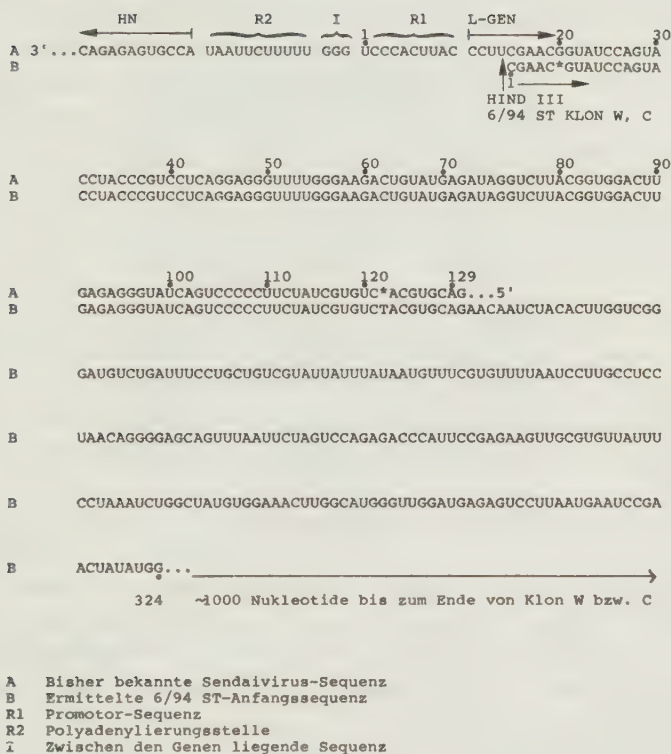


Abb. 21:

Vergleich der Nukleotidsequenzen von Sendai-L-Gen und klonierter 6/94-cDNA W und C.

Die von Gupta und Kingsbury (1984) für das L-Gen des Sendavirus ermittelte Anfangssequenz von 129 Nukleotiden (A) wurde mit den 6/94-Sequenzen der Klone W und C (B) verglichen. Hierzu wurde das Computerprogramm FORTRAN-BestFit verwendet.

rungssignale zeigte. Die Analyse ihrer Anfangssequenzen ermöglichte dann im Vergleich mit den von Gupta und Kingsbury (1984) publizierten Sequenzen die Zuordnung der Klone W und C zum Gen L des Sendai-Genoms. Die bisher von Klon E ermittelten 254 Nukleotide konnten keiner bisher bekannten Sequenz zugeordnet werden.

3.5. Nachweis viraler Nukleinsäure in infizierten Zellkulturen

In den folgenden Kapiteln werden die klonierten cDNA-Proben zum Nachweis von 6/94-Virusinfektionen eingesetzt. Es soll die Frage untersucht werden, ob sich mit den cDNA-Klonen akute, persistierende und vielleicht sogar latente Infektionen mit 6/94-Viren nachweisen lassen.

3.5.1. Abschätzung der Nachweisgrenze für virale RNA

Zunächst sollte bestimmt werden, wie sensitiv der Nachweis viraler Sequenzen in infizierten Zellen mit den klonierten cDNA-Proben ist, d.h. wieviele RNA-Kopien in akut und persistent infizierten Zellen nachweisbar sind.

Gesamt-RNA von 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen (MOI = 0,01) wurde nach drei Tagen Inkubation bei 33°C, also in der akuten Infektionsphase, isoliert, nach Denaturierung mit Glyoxal in verschiedenen Verdünnungen auf Nitrozellulose getropft und mit ³²P-nicktranslatierter DNA von Klon W hybridisiert. Gesamt-RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Abbildung 22 (2c) zeigt, daß noch 5 ng Gesamt-RNA aus akut infizierten Zellen mit der klonierten W-DNA ein sehr starkes Hybridisierungssignal ergeben, während bei der entsprechenden, nicht-infizierten RNA-Kontrolle kein positives Signal zu sehen ist (1c). Die Hybridisierung mit Klon E-DNA erbrachte identische Ergebnisse.

Durch Bestimmung der RNA-Menge und Berechnung mittels des

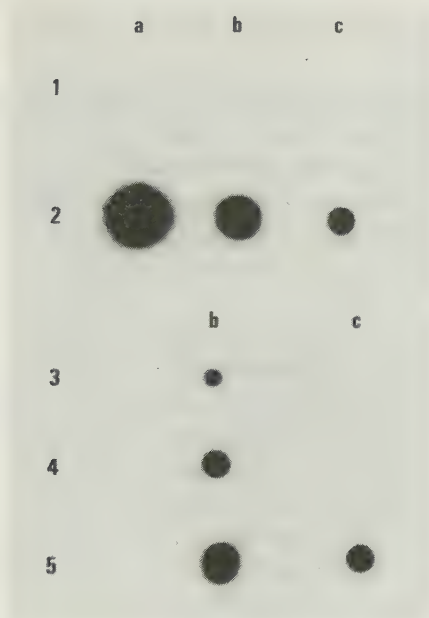


Abb. 22:

Abschätzung der Nachweisgrenze für virale RNA in akut und persistent infizierten Zellen mit der klonierten 6/94-cDNA-W als Hybridisierungsprobe.

Gesamt-RNA aus akut und persistent mit 6/94-Viren infizierten Zellen wurde nach Denaturierung mit Glyoxal in verschiedenen Verdünnungen auf einen Nitrozellulose-Filter getropft und mit ^{32}P -nicktranslatierter 6/94 ST Klon W-DNA hybridisiert, die eine spezifische Aktivität von 5×10^8 cpm/ug besaß. Als Negativkontrolle wurde Gesamt-RNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen verwendet. In Reihe a wurden jeweils 5 ug, in b 500 ng und in c 5 ng RNA aufgetragen.

Reihe 1: RNA aus nicht infizierten BSC-1-Zellen.

Reihe 2: RNA aus akut infizierten BSC-1-Zellen
(MOI=0,01, Inkubation 3 Tage bei 33°C).

Reihe 3: RNA aus persistent infizierten Cl-E-8-Zellen.

Reihe 4: RNA aus BSC-1-Zellen, die mit der Virusvariante 6/94 co infiziert worden waren
(MOI=0,01, 3 Tage bei 33°C).

Reihe 5: RNA aus BSC-1-Zellen, die mit der Virusvariante 6/94 cl* infiziert worden waren
(MOI=0,01, 3 Tage bei 33°C).

Molekulargewichts genomischer Paramyxovirus-RNA konnten Haase und Mitarbeiter (1981) bei Masernviren ermitteln, daß akut infizierte Zellen 2×10^3 virale Genomäquivalente pro Zelle enthalten. Dasselbe Ergebnis wurde auch im eigenen Labor für 6/94-infizierte Zellen erhalten (Neubert, noch unveröffentlichte Daten).

Wie schon früher beschrieben ist in produktiv persistierenden Infektionen mit 6/94-Viren in Zellkulturen die Produktion von Viruspartikeln im Vergleich zur akuten Phase stark reduziert. In einer persistent infizierten Zelle sind nur etwa 10 Kopien 6/94-RNA vorhanden (Haase et al. 1981; Neubert und Hofschneider 1983), also rund um den Faktor 200 weniger als in akut infizierten Zellen. Es muß nun gezeigt werden, ob auch eine persistierende 6/94-Infektion mit der klonierten cDNA nachgewiesen werden kann.

Als Beispiel einer persistierenden 6/94-Infektion wurde die Zelllinie Cl-E-8 (Tabelle 1) verwendet, die, wie schon im Kapitel 1.3.4. beschrieben, permanent in geringen Titern nicht-infektiöse 6/94 cl-Viren produziert. Diese produktive, persistierende Infektion, die auch durch Expression viraler Proteine auf den Zelloberflächen verfolgt werden kann, soll nun mit der klonierten Probe nachgewiesen werden.

Hierzu wurde die Gesamt-RNA der Cl-E-8-Zellen isoliert und in unterschiedlichen Verdünnungen auf Nitrozellulose getropft (Abb. 22, 3 b,c). Als positive Referenz diente RNA aus 6/94 ST akut infizierten Zellen, bei der noch 5 ng Gesamt-RNA ein positives Hybridisierungssignal erbrachten (Abb. 22, 2c), als Negativ-Kontrolle zelluläre RNA aus nicht-infizierten Zellen (Abb. 22, 1a,b,c). In der persistierenden Infektion mit 6/94 cl-Virus lassen sich in 500 ng Gesamt-RNA (Abb. 22, 3b) noch eindeutig virusspezifische Sequenzen nachweisen.

Zusammenfassend ergibt sich als Abschätzung der Nachweisgrenze bei der Hybridisierung mit klonierter

6/94-cDNA: In einer akuten Infektion erhält man mit 5 ng Gesamt-RNA aus infizierten Zellen noch ein positives Hybridisierungssignal. In einer persistierenden Infektion ergibt sich bei 500 ng Gesamt-RNA aus infizierten Zellen ein vergleichbares Hybridisierungssignal. Die klonierte cDNA erlaubt also sowohl den Nachweis akuter Virusinfektionen, wobei nach Angaben in der Literatur etwa 2×10^3 Genomäquivalente pro infizierte Zelle vorhanden sind, als auch den Nachweis persistierenden Infektionen, wobei nur etwa 10 Kopien viralen Genoms pro infizierte Zelle repräsentiert sind.

Es wurde auch überprüft, ob Infektionen mit den im Kapitel 1.3.5. beschriebenen 6/94-Virusvarianten ebenfalls mit der klonierten cDNA nachweisbar sind. In Abbildung 22 wurde Gesamt-RNA von BSC-1-Zellen aufgetropft, die mit den reaktivierten 6/94-Varianten cl* (Abb. 22, 5) bzw. co (Abb. 22, 4) infiziert worden waren (MOI = 0,01). In beiden Fällen ist das Hybridisierungssignal deutlich positiv, für 6/94 co allerdings schwächer als für 6/94 cl*. Die Infektion mit 6/94 cl*-Viren liegt, vom Hybridisierungssignal aus zu schließen, im Bereich der akuten 6/94 ST-Infektion. Die 6/94 cl*-Viren lösen also hinsichtlich der Kopienzahl pro infizierte Zelle eine der 6/94 ST-Infektion vergleichbare Situation aus, woraus man schließen könnte, daß sie durch die Serien-Zellpassagen (Kapitel 1.3.4.) vollständig reaktiviert wurden.

3.5.2. Hybridisierung mit chromosomaler DNA infizierter Zellen

Da sich eindeutig virale Nukleinsäure in persistent infizierten Zellen nachweisen läßt, eignet sich die klonierte 6/94-cDNA als einheitliche, spezifische Hybridisierungsprobe für Untersuchungen zum Mechanismus der viralen Persistenz bei Paramyxoviren. Es soll im Folgenden der Frage nachgegangen werden, in welcher Form die virale Nukleinsäure in persistent infizierten Zellen überdauert.

Die Integration viraler cDNA ins Genom infizierter Zellen stellt einen möglichen Mechanismus der viralen Persistenz dar (Neubert 1979). In bisherigen Arbeiten, die sich bei Paramyxoviren mit dem Nachweis viraler Sequenzen im zellulären Genom infizierter Zellen beschäftigen, stand keine klonierte cDNA-Probe zur Verfügung. Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, haben nur Ergebnisse, die mit einer klonierten Nachweisprobe erzielt werden können, Aussagekraft. Die Experimente, bei denen als markierte Probe virale RNA oder nicht-klonierte cDNA verwendet wurden (Zdhanov und Parfanovich 1974; Zdhanov 1976; Simpson und Iinuma 1975; Haase et al. 1981), können bestenfalls Hinweise auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure geben.

Eine Voraussetzung zum Nachweis auch weniger, integrierter cDNA-Kopien ist eine hohe spezifische Aktivität der markierten Hybridisierungsprobe. Deshalb wurde die klonierte, aus dem Gel eluierte W-DNA vor der Nick-Translation über eine Elutip-Minisäule (Kapitel 2.3.16.) von störenden Komponenten befreit. Die so gereinigte Probe erreichte in der Markierung mit ^{32}P -dCTP die vom Hersteller angegebene maximale, spezifische Aktivität von 1×10^9 cpm/ug DNA. Das erniedrigt die im vorangegangenen Kapitel abgeschätzte Nachweisgrenze von 10 Kopien viralen Genoms pro infizierte Zelle bei einer spezifischen Aktivität von 5×10^8 cpm/ug auf 5 Kopien pro Zelle bei 1×10^9 cpm/ug.

Zur Suche nach möglicherweise integrierten 6/94-cDNA-Sequenzen wurden verschiedene, infizierte Zellen herangezogen. Mit 6/94 ST-Virus akut infizierte BSC-1-Zellen, Cl-E-8-Zellen, und die P3-Zellen (Brüssow 1983), die persistent mit 6/94 ST-Virus infiziert sind. Die Zelllinien P3 und Cl-E-8 (Tabelle 1) setzen beide 6/94-Viren frei. Die P3-Zelllinie produziert aber infektiöse, die Cl-E-8-Zelllinie nicht-infektiöse Partikel. Es sollte untersucht werden, ob vielleicht schon nach kurzer Zeit, wie im Fall der akut infizierten BSC-1-Zellen, oder erst nach langer Interaktion von Virus und Wirtszelle -bei Cl-E-8 oder P3-Zellen- die

virale Information in Form von integrierter cDNA nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurde aus den Kernen der infizierten Zellen die chromosomale DNA isoliert (Kapitel 2.3.8.3.). Um Kontaminationen mit viraler RNA, die zu einem positiven Signal führen würden, zu vermeiden, wurden die DNA-Proben mit RNase I behandelt. Die eventuell in der Enzymcharge als Verunreinigung vorhandene DNase wird durch Präinkubation des Enzyms für 10 min bei 80°C inaktiviert. Diese Behandlung beeinträchtigt die Funktion der RNase nicht. Nach RNase-Behandlung wurden jeweils 30 µg chromosomale DNA auf einen Nitrozellulose-Filter getropft und mit ³²P-nick-translatierter W-DNA hybridisiert (Abb. 23). Als Negativ-Kontrollen wurde chromosomale DNA aus uninfizierten BSC-1-Zellen (Abb. 23,2) und aus nicht-infizierten CAM-Zellen (Abb. 23,5) verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten 50 pg RNA aus mit 6/94 ST-infizierten BSC-1-Zellen (Abb. 23,1).

Mit der DNA von Cl-E-8 (Abb. 23,4) und P3 (Abb. 23,3) ist ein schwach positives, mit der DNA aus den akut infizierten Zellen (Abb. 23,6) dagegen kein positives Hybridisierungssignal erkennbar. Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationen zu:

1. Das Hybridisierungssignal stammt tatsächlich von virusspezifischen Sequenzen in der DNA persistent infizierter Zellen. Das erhaltene Ergebnis erlaubt aber noch keine Aussage darüber, ob diese cDNA-Sequenzen ins Wirtsgenom integriert oder episomal vorliegen. Da außerdem durch Kernzentrifugation nie eine völlige Trennung der Nukleinsäuren aus Kern und Cytoplasma möglich ist, läßt sich zunächst nur folgern, daß im Cytoplasma oder im Kern virale cDNA-Sequenzen in den persistent infizierten Zellen vorhanden sein könnten.

2. Das Hybridisierungssignal geht auf kontaminierende, virale RNA zurück. Diese Interpretation des Ergebnisses darf nicht unterschätzt werden. Es ist nämlich nicht zu erwarten,

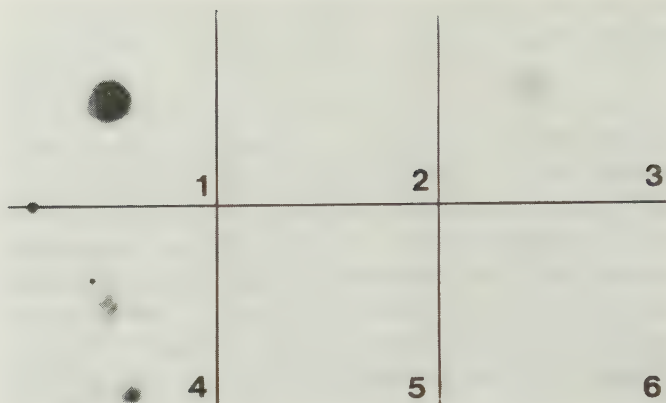


Abb. 23:

Nachweis virusspezifischer DNA-Sequenzen in 6/94-infizierten Zellen mit der klonierten 6/94 ST-cDNA W als Hybridisierungsprobe.

Aus den Zellkernen 6/94-infizierter Zellen wurde die chromosomale DNA isoliert. Nach RNase-Behandlung der DNA-Proben mit 25 ug RNase A/ml bei 37°C für 30 min. wurde jeweils 30 ug chromosomale DNA auf einen Nitrozellulose-Filter getropft und mit 32 P-nicktranslatierter Klon W-DNA hybridisiert.

- 1: Als Positivkontrolle 50 pg Gesamt-RNA aus 6/94 ST` infizierten BSC-1-Zellen (MOI=0,01, 3 Tage bei 33°C).
- 2: Als Negativkontrolle DNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen.
- 3: DNA aus 6/94-persistent infizierten P3-Zellen.
- 4: DNA aus 6/94-persistent infizierten Cl-E-8-Zellen.
- 5: Als Negativkontrolle DNA aus nicht-infizierten CAM-Zellen.
- 6: DNA aus akut 6/94 ST-infizierten BSC-Zellen (MOI=0,01, 3 Tage bei 33°C).

daß mitgereinigte RNA durch RNase vollständig verdaut wurde. Verbleibende RNA-Sequenzen, die größer als 10 Nukleotide sind, könnten ein positives Hybridisierungssignal auslösen und das Vorhandensein viraler DNA-Sequenzen vortäuschen. Hierzu muß auch beachtet werden, daß 6/94-Viren selbst kein Gen für Reverse Transkriptase besitzen, welches die virale RNA in cDNA umschreiben könnte. Das Vorkommen viraler cDNA-Sequenzen müßte also auf die Funktion einer zellulären Reversen Transkriptase zurückzuführen sein, deren Existenz aber bis heute nur in embryonalem Gewebe (Mondal und Hofschneider 1983) und nicht in differenzierten Zellen erwiesen ist.

Das erhaltene Ergebnis stellt aber trotz der genannten Einwände zunächst einen positiven Hinweis auf virale cDNA-Sequenzen in persistent infizierten Zellen dar und unterstützt damit die von Neubert (1979) erhaltenen Ergebnisse, die das Vorkommen viraler cDNA-Sequenzen in 6/94-infizierten Zellen nachwiesen.

Eine mögliche Integration von 6/94-cDNA-Sequenzen ins zelluläre Genom kann jedoch nur nachgewiesen werden, wenn eindeutig gezeigt wird, daß das Hybridisierungssignal tatsächlich mit chromosomaler DNA infizierter Zellen erhalten wird. Deshalb führt die Dot-Blot-Hybridisierung, die eine Unterscheidung zwischen chromosomaler DNA und anderen Nukleinsäuren nicht zuläßt, hier nicht zum Ziel.

Die chromosomale, ungeschnittene DNA der oben beschriebenen, infizierten Zellen wurde deshalb nach RNase-Behandlung im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulose mit ^{32}P -markierter W-DNA im Southern Blot hybridisiert. 30 µg ungeschnittene chromosomale DNA ist dabei weitgehend in einer hochmolekularen Bande konzentriert. Zelluläre und virale RNA wurden mit RNase verdaut und wären nach Degradation höchstens noch im unteren Bereich des Gels zu finden. Nicht nachweisbar ist mit dieser Methode, wenn nur solche Teile des viralen Genoms

integriert wären, die durch die klonierte cDNA nicht repräsentiert sind.

Das Ergebnis der Hybridisierung chromosomaler DNA aus Cl-E-8, P3 und aus mit 6/94 ST akut-infizierten BSC-1-Zellen ist in Abbildung 24 dargestellt. Als Negativkontrolle wurden 30 ug chromosomale DNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle, die gleichzeitig einen Größenmarker darstellt, wurde in Spur 1 die ungeschnittene DNA (100 pg) des lambda-Klons W aufgetragen. Die lambda-DNA mit den W-Insert hat eine Länge von 39,9 kb. Da in diesem Größenbereich das Agarosegel keine gute Auflösung mehr besitzt, kann man die chromosomale DNA ungefähr im selben Bereich erwarten. Episomal vorliegende virale cDNA voller Genomlänge mit 15 kb (Kolakofsky et al. 1974) wäre jedoch von der viel längeren, chromosomalen DNA unterscheidbar. Besitzen episomale cDNA-Sequenzen aber unterschiedliche Längen, so ist wegen der heterogenen Verteilung über die gesamte Auftrennstrecke kein positives Hybridisierungssignal im Southern Blot zu erwarten. Das Vorliegen heterogener, episomaler 6/94-cDNA kann zwar nicht ausgeschlossen werden, eine Reaktivierung des Virus ist jedoch dann wegen der unvollständigen Genomfragmente nicht möglich. Die Infektion führt in diesem Fall in eine Sackgasse und hat für den Mechanismus der Persistenz keine Bedeutung mehr.

In dem gerade beschriebenen Experiment wurden pro Spur 30 ug chromosomale DNA aus persistent infizierten Zellen, z.B. Cl-E-8-Zellen, verwendet. Beim Einsatz von 500 ng Gesamt-RNA dieser Zellen (vgl. Kapitel 3.5.1. und Abb. 22, 3b) ließ sich virale RNA nachweisen, die etwa 10 Kopien viralen Genoms pro Zelle entspricht. Da für den Nachweis der viralen RNA diesselbe Hybridisierungsprobe eingesetzt wurde, wie für die Suche nach integrierten, viralen DNA-Sequenzen, aber etwa 60-mal soviel Nukleinsäure aus infizierten Zellen verwendet wurde, erniedrigt sich auch die theoretische Nachweisgrenze. Abbildung 24 zeigt jedoch, daß keinerlei positives Hybridisierungssignal im Bereich der chromosomalen

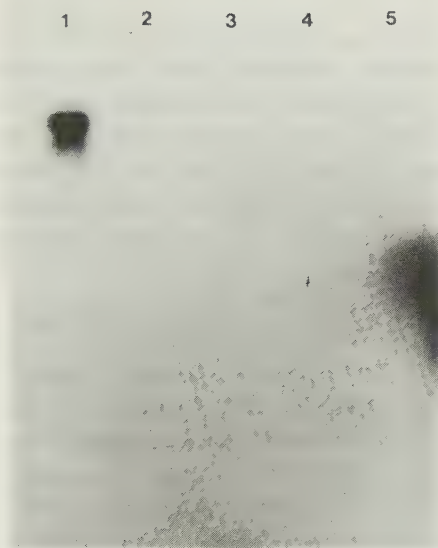


Abb. 24:

Hybridisierung chromosomaler DNA aus 6/94-infizierten Zellen mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon W-DNA im Southern Blot.

Chromosomale DNA aus 6/94-infizierten Zellen wurde nach Behandlung mit 25 ug/ml RNase A für 30 min. bei 37°C in einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Diffusion auf Nitrozellulose übertragen. Der Southern Blot wurde mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon W-DNA hybridisiert, die eine spezifische Aktivität von 1×10^9 cpm/ug besaß.

Spur 1: Als Positivkontrolle 100 pg ungeschnittene Gesamt-DNA des Klons-W mit 39,9 kb (einschließlich der Vektorarme).

Spur 2: 30 ug chromosomale DNA aus 6/94-persistent infizierten P3-Zellen.

Spur 3: 30 ug chromosomale DNA aus 6/94-persistent infizierten Cl-E-8-Zellen.

Spur 4: 30 ug chromosomale DNA aus 6/94-akut infizierten BSC-1-Zellen (MOI=0,01, 3 Tage bei 33°C).

Spur 5: 30 ug chromosomale DNA aus nicht-infizierten BSC-1-Zellen.

DNA von Cl-E-8- (Spur 3), P3- (Spur 2) und akut infizierten BSC-1-Zellen (Spur 4) zu erkennen ist. Berücksichtigt man den Faktor 60, ergibt sich, daß keine oder weniger als 0,1 Kopien chromosomal integrierter 6/94-cDNA pro persistent infizierte Zelle vorliegen. Trotz der hohen Sensitivität und der absoluten Spezifität der Hybridisierungsprobe sind keine ins zelluläre Genom integrierten viralen Sequenzen nachweisbar.

Die Positiv-Kontrolle (Abb. 24, Spur 1) zeigt eindeutig, daß Transfer und Hybridisierung funktionierten. Das Experiment wurde zudem mehrmals und mit allen 6/94-cDNA-Klonen wiederholt. Es war reproduzierbar nie eine Hybridisierung der 6/94-cDNA-Proben W, E, und C mit der chromosomalen DNA aus akut oder produktiv persistent infizierten Zellen nachweisbar.

Das Ergebnis legt den Schluß nahe, daß ein anderer Mechanismus als die Integration viraler cDNA ins Wirtsgenom in der Regel zur Persistenz von Paramyxoviren führt. Anstatt als DNA könnte das Virus nur noch als RNA seine genetische Information in der Wirtszelle konservieren. In produktiv persistierend infizierten Zellen ist das der Fall. Dies ist aber nicht überraschend, denn von diesen Zellen werden Virionen produziert, die genomische RNA erhalten, was wiederum deren intrazelluläre Existenz voraussetzt. Die virale RNA ist auch die Voraussetzung für die Synthese von mRNA und die Expression viraler Proteine.

Ungeklärt ist jedoch, in welcher Form -RNA oder DNA-viruspezifische Nukleinsäure in latenten, also nicht-produktiven persistierenden Infektionen in der Zelle überdauert. Es mußte also Ziel der weiteren Arbeit sein, eine latente Infektion zu etablieren, um diese Untersuchungen überhaupt durchführen zu können. In Erinnerung an die Herkunft des 6/94-Virus, das aus einer ursprünglich wahrscheinlich latenten Infektion der Gehirnzellen von M.S.-Patienten stammt (Neubert 1979), sollte versucht

werden, ein Modellsystem zu entwickeln, das die damalige Situation widerspiegelt. Dem Tiermodell wurde gegenüber der Zellkultur der Vorzug gegeben, da systemische Faktoren, die außerhalb eines Organismus' oder ohne längere Interaktion mit dem Organismus nicht auftreten, eine vielfältige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung einer latenten Infektion spielen könnten.

3.6. Das 6/94-Virus im Tiermodell

In den folgenden Kapiteln wird der Verlauf einer 6/94 ST-Infektion über den langen Zeitraum von mehr als 400 Tagen im Tiermodell beschrieben. Zum Nachweis der Viren oder ihrer Bestandteile mußte in vielen Fällen auf Zellkulturen ausgewichen werden, die aus dem Gewebe der Mäuse stammten. Durch die Vermehrung der Zellen in Kultur kann die Ausbeute an produzierten Viren, an Proteinen und RNA erhöht werden und damit der entsprechende Nachweis leichter durchgeführt werden. Man muß bei der Interpretation von Ergebnissen jedoch beachten, daß bei der Kultivierung von Zellen auf die Dauer eine Selektion auf bestimmte Zelltypen, so z.B. auf infizierte oder nicht-infizierte Zellen, erfolgen kann. Es ist deshalb notwendig, den Nachweis viraler Bestandteile soweit möglich sowohl im Organismus selbst als auch vergleichend in den entsprechenden Zellkulturen durchzuführen.

3.6.1. Die akute Phase des Infektionsverlaufs

Am Versuchsbeginn wurden insgesamt 33 weibliche C129-Mäuse im Alter von 6-8 Wochen intracerebral mit 30 μ l Viruslösung infiziert. Die Impfdosis betrug 5×10^5 bzw. 1×10^3 KID 6/94 ST-Virus pro Maus. Als Negativkontrolle erhielten 18 Mäuse das gleiche Volumen PBS injiziert. Keines der Tiere starb direkt bei der Injektion des Virusmaterials bzw. der PBS-Lösung an Verletzungen der Hirnhemisphären, noch zeigten die Tiere später irgendwelche Lähmungserscheinungen. Fünf Tage nach der Injektion wurden bei den virusinfizierten

Tieren schwache Krankheitssymptome, wie struppiges Fell, leichtes Zittern und Appetitlosigkeit beobachtet, welche als typische Zeichen einer akuten Infektion gewertet werden können. Diese Symptome verschwanden aber innerhalb weniger Tage. Keines der Tiere starb an der akuten Infektion.

3.6.1.1. Immunantwort der Mäuse auf die akute Infektion

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen zur 6/94-Persistenz in Mäusen (Gilden et al. 1976) ist ein deutlicher Anstieg des Antikörpertiters im Serum 6/94 ST-infizierter Mäuse 15 Tage nach Infektion (PID = post infection day) im HAH-Test (Kapitel 2.3.2.5.) meßbar (Tabelle 8).

3.6.1.2. Virusspezifische Immunfluoreszenz in den Gehirnschnitten der akut infizierten Mäuse

Virale Proteine im Cytoplasma und auf den Oberflächen infizierter Zellen lassen sich durch virusspezifische Immunfluoreszenz in den Schnitten aus Gehirngewebe nachweisen. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Simon vom Institut für Psychiatrie durchgeführt. 6/94-infizierte Zellen werden dabei durch FITC-gekoppelte Anti-Sendai-Antikörper sichtbar gemacht. Die Abbildung 25 zeigt den Nachweis viraler Proteine im Gehirnschnitt einer mit 6/94 ST-infizierten Maus am PID 15, also in der akuten Phase der Infektion. In den ersten Wochen der Infektion wurde dieser Test an weiteren Tieren wiederholt. Es waren mittels der Immunfluoreszenz reproduzierbar virale Proteine in den Gehirnzellen infizierter Mäuse nachweisbar.

3.6.1.3. Nachweis infektiöser Viren im Überstand der Gehirnzellkulturen

Zum Nachweis der Freisetzung infektiöser 6/94-Viren, wurden die Gehirnzellen mit 6/94 ST infizierter Mäuse am PID 15 mit Gehirnzellen nicht-infizierter, neugeborener

Tabelle 8:

Ergebnisse des reziproken HAH-Tests der Mäuse-Seren

PID	5×10^5 a	10^3 a	PBS b
0	32	-	-
15	512	-	32
373	32	32	32
423	32	32	32

a Inokulum KID 6/94 ST pro Maus

b Inokulation von PBS als Negativ-Kontrolle

Es handelt sich bei den Angaben um Durchschnittswerte
aus den Seren mehrerer Tiere.



Abb. 25:

Nachweis der Expression viraler Proteine im Gehirnschnitt einer 6/94 ST-infizierten Maus am PID 15 durch Immunfluoreszenz.

Eine C129 Maus, die intracerebral mit 5×10^5 KID 6/94 ST-Virus infiziert worden war, wurde 15 Tage nach Infektion getötet und das Gehirn entnommen. Von Dr. J. Simon vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie wurde das Gewebe mit einem Kryotom geschnitten. Mit 6/94-Virus infizierte Zellen, die virale Proteine exprimieren, wurden dann mit FITC-gekoppeltem Anti-Sendai-Serum sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt bei 400-facher Vergrößerung die Fluoreszenz von 6/94-infizierten Zellen in der akuten Infektionsphase.

C129-Mäuse kokultiviert. Ohne einen vorhandenen Zell-Monolayer lassen sich Gehirnzellen erwachsener Mäuse sehr schwer in Kultur halten. Um unerwünschte Nebeneffekte durch Inkompatibilität mit Fremd-Zellen soweit möglich auszuschließen, wurden zur Kokultivierung Mäuse-Gehirnzellen vom selben Stamm verwendet, und zwar von nicht-infizierten, neugeborenen C 129 Mäusen. In Abbildung 26 sind kokultivierte Gehirnzellen aus 6/94-infizierten (Abb. 26, A) und nicht-infizierten Mäusen (PBS-Kontrolle, Abb. 26, B) zu sehen. Die beiden Kulturen sind morphologisch nicht unterscheidbar.

In der Literatur ist beschrieben, daß die Kokultivierung und die Fusion infizierter Zellen eine Virusproduktion auslösen kann (ter Meulen et al. 1972; Wroblewska et al. 1976; Koprowski 1971; Neubert et al. 1983; Simon et al. eingereicht). Die am PID 15 kokultivierten Mäuse-Gehirnzellen wurden deshalb im indirekten HAD-Test (Kapitel 2.3.2.3.) insgesamt 250 Tage lang auf Freisetzung infektiöser Viren untersucht. Der Zellkulturüberstand wurde mit BHK-21-Zellen auf Infektiosität getestet, indem der Prozentsatz hämagglutininexprimierender Indikatorzellen bestimmt wurde (Abb. 27). Direkt nach Kultivierung der 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen war keine Freisetzung infektiöser Viruspartikel meßbar. Einen Monat danach konnten im Medium der infizierten Mäuse-Gehirnzellen infektiöse 6/94-Viren nachgewiesen werden. 95% der Indikatorzellen waren im HAD-Test positiv (Abb. 27). Nach dieser signifikanten Stimulierung der Virusproduktion in den kokultivierten Gehirnzellen nahm die Virusfreisetzung wieder ab, bis ab DIC 74 (day in culture 74) keine infektiösen Viren mehr nachgewiesen werden konnten. Die Viren, die von den Gehirnzellen der mit 6/94 infizierten Mäuse produziert werden, sind tatsächlich auf die Infektion der Tiere zurückzuführen, da in den Gehirnzellen nicht-infizierter Kontroll-Mäuse nach Kokultivierung während des ganzen Beobachtungszeitraums keine Freisetzung infektiöser Partikel gemessen wurde. Wurden die Gehirnzellen zu einem späteren

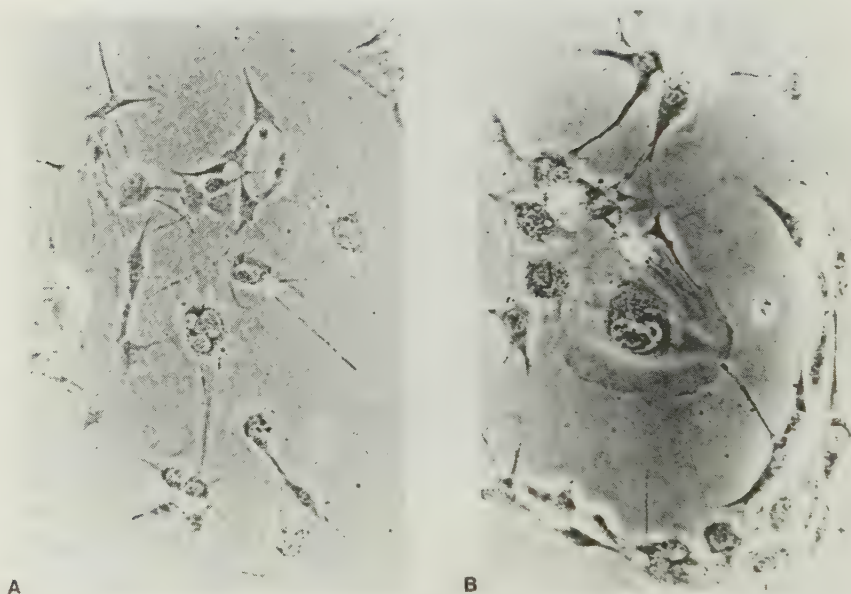


Abb. 26:

Kokultivierung von 6/94 ST-infizierten- mit nicht-infizierten Mäuse-Gehirnzellen.

Gehirnzellen von 6/94 ST-infizierten (5×10^5 KID pro Maus) und von Kontroll-Mäusen wurden 15 Tage nach Infektion extrahiert und mit Gehirnzellen neugeborener, nicht-infizierter C129-Mäusen kokultiviert. Die Abbildung A zeigt eine 6/94-infizierte Zellkultur in der 21. Passage bei einer Vergrößerung von 1:125. Die Abbildung B zeigt eine Kontrollkultur von Gehirnzellen nicht-infizierter Tiere in der 18. Passage bei einer Vergrößerung von 1:250. Die Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert.

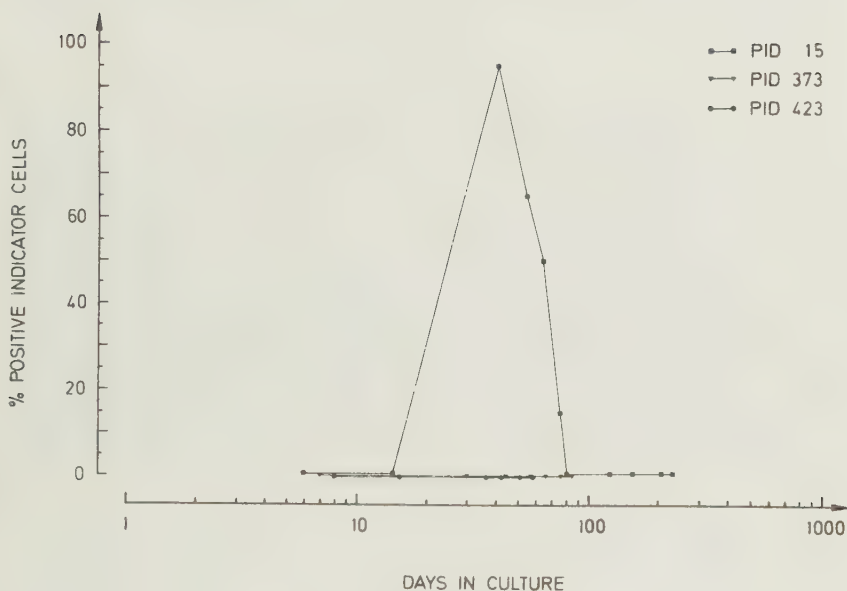


Abb. 27:

Freisetzung infektiöser 6/94-Viren durch Kokultivierung der 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion der Tiere.

Die Gehirnzellen von C129 Mäusen, die mit 5×10^5 KID 6/94 ST pro Maus infiziert worden waren, wurden zu verschiedenen Zeiten nach Infektion (PID 15, 373, 423) entnommen und mit Gehirnzellen neugeborener, nicht-infizierter C129 Mäuse kokultiviert. Die Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert. Die Zellüberstände wurden insgesamt 250 Tage lang im indirekten HAD-Test auf Freisetzung infektiöser Viren untersucht.

Zeitpunkt nach Infektion der Tiere kokultiviert, also am PID 373 und PID 423, konnte keine Virusproduktion mehr ausgelöst werden.

Ein grundsätzlich anderes Bild ergab sich, wenn Tiere statt mit dem 6/94 ST mit den Virusvarianten 6/94 cl* und 6/94 co infiziert wurden (Abb 28). In diesem Fall setzt die Virusproduktion nach Kokultivierung der Mäuse-Gehirnzellen am PID 15 zwar ebenfalls verzögert ein, bleibt jedoch dann auf dem erreichten Niveau bestehen. Die Infektion blieb während des Untersuchungs-Zeitraums von 240 Tagen durch permanente Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln aus den Zellen nachweisbar. Diese Kulturen sind als persistent infiziert anzusehen. Nur im Fall der inaktiven 6/94 cl-Viren konnten in den Zellüberständen keine Viren nachgewiesen werden.

Dieser interessante Befund zeigt, daß sich mit den Virusvarianten 6/94 cl* und 6/94 co keine Latenz etablieren läßt, da die Infektion produktiv bleibt. Weitere Untersuchungen zur Latenz wurden deshalb nur an 6/94 ST-infizierten Mäusen durchgeführt.

3.6.1.4. Nachweis viraler RNA in den Gehirn-Zellkulturen

In der akuten Phase der Infektion ist das Vorhandensein viraler RNA Voraussetzung für die Produktion von Viruspartikeln und für die Expression viraler Proteine, die auch zur Immunantwort im Organismus führt. Da außerdem die Anzahl der zur Verfügung stehenden Tiere begrenzt war, wurde auf den Nachweis viraler RNA direkt aus dem Hirngewebe infizierter Mäuse verzichtet. Es wurden in dieser Infektionsphase nur die kokultivierten Mäuse-Gehirnzellen (Kapitel 3.6.1.3.) auf das Vorhandensein viraler Nukleinsäure untersucht. Hierzu wurde cytoplasmatische RNA aus den Zellkulturen, die am PID 15 kultiviert und bereits 45 Tage in Kultur gehalten worden waren, isoliert, mit DNase behandelt, mit Glyoxal denaturiert und im Dot Blot mit

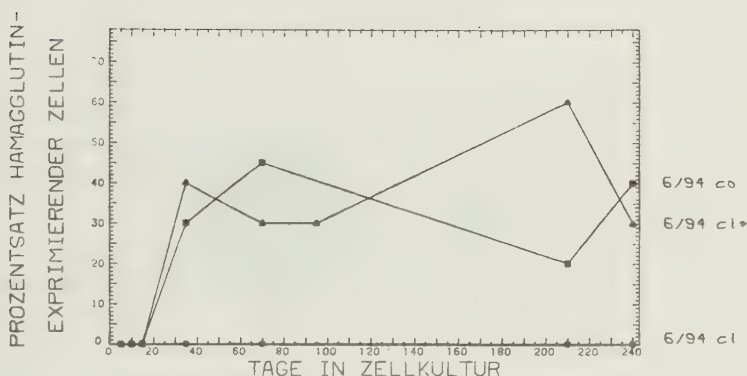


Abb. 28:

Durch Kokultivierung ausgelöste Freisetzung von infektiösen 6/94-Viren aus Gehirnzellen von Mäusen, die mit 6/94-Virusvarianten aus persistierenden Infektionen infiziert worden waren.

Die Gehirnzellen von Mäusen, die mit den Virusvarianten 6/94 co, 6/94 cl* und 6/94 cl infiziert worden waren, wurden 15 Tage nach Infektion entnommen und mit Gehirnzellen neugeborener, nicht-infizierter Mäuse kokultiviert. Die Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert. Der Verlauf der Virusfreisetzung wurde über einen Zeitraum von 240 Tagen im indirekten HAD-Test verfolgt.

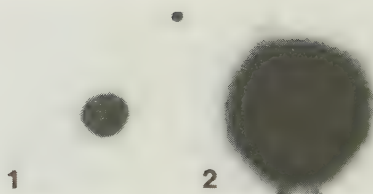


Abb. 29:

Hybridisierung von cytoplasmatischer RNA aus 6/94 ST-infizierten Mäusegehirn-Zellkulturen in der akuten und latenten Phase der Infektion mit ^{32}P -nicktranslatierter 6/94 ST Klon W-DNA.

Aus Gehirnzellen, die am PID 15 kokultiviert worden waren, wurde nach 254 Tagen (7. Passage) in Kultur (1) und nach 45 Tagen (38. Passage) in Kultur (2) cytoplasmatische RNA isoliert, mit 25 μg DNase I/ml für 30 min. bei 37°C in Inkubationspuffer für Eco RI behandelt und nach Denaturierung mit Glyoxal jeweils 1 μg auf einen Nitrozellulose-Filter getropft. Der Filter wurde mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon W-DNA hybridisiert.

³²P-nicktranslatierter Klon W-DNA hybridisiert (Abb. 29, 2). Aus der Stärke des Hybridisierungssignals läßt sich schließen, daß die Zellen akut infiziert waren. In diesem Experiment konnte mit der klonierten cDNA W eindeutig das Vorhandensein von 6/94-RNA in den akut infizierten Mäuse-Gehirnzellen nachgewiesen werden.

Insgesamt gesehen konnte die akute Phase der 6/94-Infektion durch folgende Kriterien bestimmt werden:

1. den erhöhten Antikörpertiter im Serum der Mäuse,
2. die meßbare Expression viraler Proteine in den Gehirnzellen,
3. die Freisetzung infektiöser Viruspartikel aus den Gehirnzellen nach Kokultivierung und
4. das Vorhandensein viraler RNA.

3.6.2. Die latente Phase der Infektion

Die nach den bisherigen Untersuchungen verbliebenen 6/94-infizierten Mäuse wurden nach der akuten Phase weiter beobachtet. Sie zeigten zunächst keine auffälligen Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren. Auf einige Veränderungen, die erst während der langen Beobachtungszeit erkannt wurden, sei jedoch hingewiesen. Die infizierten Mäuse liefen breitbeinig und in geduckter Haltung. Möglicherweise ist diese abnorme Bewegungsart auf einen gestörten Gleichgewichtssinn zurückzuführen.

Histologische Untersuchungen an Gehirnschnitten der infizierten Mäuse mehr als ein Jahr nach Infektion, die in Zusammenarbeit mit Dr. Simon durchgeführt wurden, ließen erst in der Feinanalyse mit Anti-Laminin- und Anti-Fibronektin-Immunfluoreszenz Veränderungen an der Basalmembran der Endothelzellen, welche die Gefäße im Gehirn auskleiden, erkennen (Simon et al. eingereicht). Bemerkenswert ist außerdem, daß im Beobachtungszeitraum von mehr als 400 Tagen nach Infektion keine der infizierten Mäuse an Tumoren oder Leukämie erkrankte. In der Kontrollgruppe aber starben 15%

der nicht infizierten Tiere. Zwei dieser verstorbenen Tiere wurden von Dr. Erfle (Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg bei München) untersucht. Er diagnostizierte in beiden Fällen Mäuse-Leukämie. Die Anzahl der Tiere reicht zwar für eine Statistik nicht aus, der Befund ist jedoch insofern zu beachten, als schon von Takeyama und Mitarbeitern (1979) beschrieben wurde, daß die Infektion mit Sendaiviren zu erhöhter Tumoresistenz von Mäusen führt. Um einen möglichen Einfluß des Virus auf die genannten Beobachtungen diskutieren zu können, ist es zunächst nötig, zu untersuchen, ob nach mehr als einem Jahr nach Infektion das Virus überhaupt in irgendeiner Form in den Tieren nachweisbar ist, oder ob das Virus vollständig eliminiert wurde. Im folgenden Kapitel wurde zunächst versucht, virale Proteine in den 6/94-infizierten Tieren nachzuweisen.

3.6.2.1. Suche nach viralen Antigenen im Serum der infizierten Mäuse 373 und 423 Tage nach Infektion

373 und 423 Tage nach Infektion wurden weitere Mäuseseren im HAH-Test untersucht. In beiden Fällen waren die Antikörpertiter infizierter Mäuse mit denen nicht-infizierter Kontrollmäuse identisch (Tabelle 8). Im Serum der infizierten Tiere ließen sich demnach mehr als ein Jahr nach Infektion keine virusspezifischen Antikörper mehr nachweisen. Der fehlende Antikörpertiter im Serum der 6/94-infizierten Mäuse am PID 373 und PID 423 könnte bedeuten, daß die Expression viraler Oberflächenantigene blockiert oder zumindest so stark reduziert ist, oder daß die Antigenexpression vom Immunsystem nicht erkannt werden kann, und deshalb im HAH-Test nicht meßbar wird. Aus diesem Grund sollten weitere Verfahren zum Nachweis viraler Proteine in den infizierten Mäuse-Gehirnzellen angewendet werden.

3.6.2.2. Test auf Expression viraler Proteine in den Gehirnschnitten der Mäuse mit der Immunfluoreszenz-Technik

Mittels der Immunfluoreszenz-Technik wurde versucht, virale Proteine auf den Oberflächen und auch im Cytoplasma infizierter Zellen nachzuweisen. Während 15 Tage nach Infektion, also in der akuten Phase, deutlich 6/94-positive Zellen in den Schnitten aus Gehirngewebe 6/94-infizierter Mäuse nachgewiesen werden konnten (Kapitel 3.6.1.2.), waren 373 Tage nach Infektion keine virus-positiven Zellen mehr zu finden. Der Immunfluoreszenz-Test blieb auch am 474. Tag nach Infektion negativ.

3.6.2.3. ELISA zum Nachweis viraler Proteine aus dem Gehirn der infizierten Mäuse

Ein sehr empfindlicher Nachweis für virale Proteine ist im ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) möglich (Engvall und Perlmann 1972; Crowther und Abu-el Zein 1978). Für diesen Test wurden am PID 373 und 423 die Gesamt-Proteine direkt aus dem Hirngewebe der infizierten Mäuse isoliert und auf eventuell vorhandene, virale Proteine durch die spezifische Antikörperreaktion mit Parainfluenza-1-Antiserum untersucht. Zur positiven Kontrolle wurden Proteine aus der produktiven Infektion der C1-E-8 Zellen verwendet. Als Negativkontrollen, zur Bestimmung der Background-Werte des Tests, wurden Gesamtproteine von nicht-infizierten CV-1-Zellen, von nicht-infizierten Gehirnzell-Kulturen neugeborener Mäuse und aus dem Gehirn der Kontrollmäuse, denen nur PBS injiziert worden war, verwendet. In allen Fällen wurde 50 µg Gesamtprotein im Test eingesetzt. Die Nachweisgrenze von 200 pg Virusprotein wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt, die Sendavirus-Gesamtproteine aus gereinigten Viruspartikeln, also alle Strukturproteine, enthält:

Nachweisgrenze im ELISA

Verdünnungen der Sendaivirus- Gesamtproteine	Ergebnis im ELISA
25 ng	+
5 ng	+
1 ng	+
200 pg	+
40 pg	-

50 ug Gesamtprotein aus	Ergebnis im ELISA
Cl-E-8-Zellen	++
nicht-infizierte CV-1-Zellen	-
6/94-infiziertem Mäusegehirn (PID 373, 423)	-
nicht-infiziertes Mäusegehirn (PID 373, 423)	-
nicht-infizierte Mäusegehirn-Zellkulturen	-

In 50 ug Gesamt-Protein aus den Cl-E-8-Zellen, die produktiv persistent infiziert sind, war die Expression viraler Proteine im ELISA sehr deutlich meßbar. Unter Verwendung von 50 ug Gesamtprotein aus dem Gehirn der infizierten Mäuse vom Tag 373 und 423 nach Infektion verlief der Test jedoch negativ, denn es wurden nur die Werte der Negativkontrollen erzielt. 50 ug Gesamtprotein der 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen enthalten demnach, wenn überhaupt, weniger als 200 pg virales Protein.

Zusammenfassend ergibt sich die Aussage, daß in 6/94-infizierten Mäusen 373 und 423 Tage nach Infektion keine viralen Proteine mehr auf den Oberflächen und im Cytoplasma der Gehirnzellen nachweisbar waren.

3.6.2.4. Nachweis der Expression viraler Proteine in den Gehirn-Zellkulturen

Da virale Proteine in den Mäusegehirnen nicht direkt festgestellt werden konnten, ergab sich dann noch die Frage, ob vielleicht in den Gehirn-Zellkulturen dieser Nachweis möglich ist. Hierzu wurde der direkte und indirekte HAD-Test (Kapitel 2.3.2.3.) herangezogen, bei dem die Expression viraler Proteine in Zellkultur gemessen werden kann. Schon im Kapitel 3.6.1.3. war beschrieben worden, daß das Medium der Zellkulturen vom PID 373 und PID 423 250 Tage lang regelmäßig im indirekten HAD-Test auf seinen Gehalt an infektiösen Viren getestet wurde. Zu keinem Zeitpunkt konnten infektiöse Viruspartikel aus den Gehirn-Zellkulturen nachgewiesen werden (Abb. 27). Da die Möglichkeit besteht, daß es in der latenten Phase nur zu einer Expression viraler Proteine auf den Zelloberflächen kommt, aber keine infektiösen Partikel gebildet werden, wurden die Gehirn-Zellkulturen vom PID 373 und 423 noch im direkten HAD-Test auf virale Oberflächenantigene untersucht. Aber auch dieser Test verlief negativ. In den Kulturen vom PID 373 und 423 wurden nie Hämagglutinin-exprimierende Zellen entdeckt.

Der Nachweis der cytoplasmatischen, viralen Proteine in infizierten Zellkulturen ist auch mit der Immunfluoreszenz-technik möglich. In der akuten Phase der Infektion konnten in den Gehirn-Zellkulturen vom PID 15 mit Hilfe dieser Technik eindeutig virus-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 30). Nach 74 Tagen in Kultur verlief aber auch dieser Test negativ. In den an PID 373 und PID 423 angelegten Zellkulturen konnten in der Immunfluoreszenz nie 6/94-positive Zellen entdeckt werden. In dieser späten



Abb. 30:

Viruspezifische Immunfluoreszenz in kultivierten Gehirnzellen einer 6/94 ST-infizierten Maus vom PID 15. Die Gehirnzellen einer C129 Maus, die mit 5×10^5 KID 6/94 ST-Virus infiziert worden war, wurden am 15. Tag nach Infektion entnommen. 30 Tage nach Kokultivierung (5. Passage) mit nicht-infizierten Gehirnzellen einer neugeborenen C129 Maus wurden 6/94-infizierte Zellen, die virale Proteine exprimieren, mit FITC-gekoppeltem Anti-Sendai-Serum sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt bei 400-facher Vergrößerung die Fluoreszenz von 6/94-infizierten Gehirnzellen in Kultur aus der akuten Infektionsphase.

Infektionsphase sind also mit den angewandten Methoden auch in den Gehirn-Zellkulturen der 6/94-infizierten Mäuse keine viralen Proteine meßbar.

3.6.2.5. Zwischenzusammenfassung

Ein Jahr nach Infektion konnten weder in den Mäusegehirnen direkt, noch in den kokultivierten Gehirnzellen 6/94-spezifische Proteine nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse müssen zu der Annahme führen, daß entweder das Virus aus den Gehirnzellen der infizierten Mäuse eliminiert wurde, oder aber das Virus latent in den Zellen persistiert. Zum Überdauern des Virus ist mindestens die virale Nukleinsäure nötig. Die Berichte über die Langzeit-Persistenz aller Paramyxoviren (Koprowski 1982), ermutigten zur Suche nach dem viralen Genom in den nicht-produzierenden Gehirnzellen der 6/94-infizierten Mäuse. Da lange Zeit die Integration viraler cDNA ins Genom infizierter Zellen als möglicher Mechanismus der viralen Persistenz von Paramyxoviren diskutiert wurde, wurden auch die Gehirnzellen der Mäuse zunächst auf virusspezifische DNA-Sequenzen untersucht.

3.6.2.6. Suche nach virusspezifischen DNA-Sequenzen in den Gehirnzellen der Mäuse

Die Gehirne von Mäusen wurden am PID 15, 373 und 423 entnommen und geteilt. Ein Teil wurde kokultiviert, aus dem anderen Teil wurde direkt die Gesamt-Nukleinsäure isoliert. Nach unterschiedlichen Zeiten in Kultur (45-254 Tage) wurde ebenfalls die Gesamt-Nukleinsäure isoliert. Nach RNase-Behandlung und Hitzedenaturierung wurden jeweils 2 µg DNA aus dem Gewebe und 5 µg DNA aus den kultivierten Zellen auf Nitrozellulose getropft. Obwohl mittels der Absaugapparatur die Nukleinsäure auf einen kleinen Punkt konzentriert wurde, konnte in keinem Fall ein positives Hybridisierungssignal mit ³²P-nicktranslatierter W-DNA erkannt werden. Weder kurz nach der Infektion (PID 15), noch nach langer

Zeit der möglichen Interaktion von Virus und Wirtszelle (PID 373 und 423) waren virusspezifische cDNA-Sequenzen nachweisbar.

Da in diesem Experiment Gesamt-DNA aus den infizierten Zellen eingesetzt wurde, gilt der negative Befund sowohl für cytoplasmatische als auch für DNA aus dem Kern. Es sind also weder ins Genom integrierte noch episomale, virale cDNA-Kopien nachweisbar. Im Mäusesystem konnten also keine virusspezifischen cDNA-Sequenzen nachgewiesen werden, obwohl die Nachweisgrenze mit 0,1 Kopien 6/94-cDNA pro infizierter Zelle verglichen mit anderen beschriebenen Grenzwerten relativ hoch liegt (Haase et al. 1981; Brahic et al. 1981; Puga et al. 1978).

Die von Neubert (1979) gezeigten virusspezifischen cDNA-Sequenzen stammen nicht aus Mäusezellen, sondern aus einer Fusionszelllinie mit humanen Gehirnzellen. Beide Ergebnisse sind deshalb nicht unbedingt vergleichbar, da es durchaus möglich ist, daß das 6/94-Virus an humane Gehirnzellen besser als an animale Zellen adaptiert ist. So könnte eine hypothetische, humane Reverse Transkriptase an dem 6/94-Substrat vielleicht besser als diejenige der Maus arbeiten.

3.6.2.7. Nachweis latenter, viraler RNA in den Gehirnzellen der Mäuse und in den Gehirn-Zellkulturen

Da keine 6/94-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, war es das Ziel der folgenden Experimente, nach einer latenten, viralen RNA in den Gehirnzellen der 6/94 ST-infizierten Mäuse zu suchen. Am PID 373 und 423, also mehr als ein Jahr nach der letzten meßbaren Expression viraler Proteine, wurde Gesamt-RNA aus Gehirn- und Lungengewebe von Mäusen mit der Guanidinium-Rhodanid-Methode isoliert, gereinigt, mit DNase behandelt und nach Denaturierung mit Glyoxal auf Nitrozellulose getropft. Durch die Isolierung der RNA mit der Guanidinium-Rhodanid-Methode, bei der die

DNA im CsCl-Stufengradienten abgetrennt wird, und die DNase-Behandlung war sichergestellt, daß es sich bei der eingesetzten Nukleinsäure um RNA handelt. Für den Vergleich mit den Kontrollen (Abb. 31, 1, 4) war es entscheidend, daß in allen Fällen die gleiche Menge an RNA eingesetzt wurde. Der Dot Blot wurde mit 6/94 ST-spezifischer Klon-W-DNA hybridisiert (Abb. 31).

In den Gehirnzellen der infizierten Mäuse konnten eindeutig virale RNA-Sequenzen nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß der Hybridisierung proportional zur Impfdosis war (Abb. 31, 2,3). In der Lunge (Abb. 31, 5) konnten wesentlich weniger virale Sequenzen nachgewiesen werden als im Gehirn. Hier war das Signal aber immer noch deutlich positiv gegenüber den Negativkontrollen der Gehirne und Lungen nicht-infizierter Tiere. Mit der DNA des Klons E als Hybridisierungsprobe wurde dasselbe Ergebnis erzielt.

Das Hybridisierungsexperiment mit der klonierten cDNA zeigt eindeutig, daß nach 423 Tagen eine latente 6/94-Infektion in der Maus auf RNA-Ebene nachweisbar ist, während zu dieser Zeit auf Protein-Ebene die Persistenz des Virus nicht gezeigt werden konnte.

Tritt dieser Mechanismus der viralen Persistenz, also die Persistenz des Virus in Form seiner latenten, viralen RNA nur im intakten Organismus auf? Ist dieser Mechanismus nur in vivo bedeutungsvoll? Oder ermöglicht er dem Virus auch außerhalb des Organismus im Zellkultursystem und damit ohne den Einfluß von Immunsystem und anderer Faktoren das Überdauern in den Wirtszellen? Zur Beantwortung dieser Fragen wurde untersucht, ob in vitro in der Langzeitkultivierung der Gehirnzellen ebenfalls latente 6/94-RNA nachgewiesen werden kann.

Aus Gehirnzellen, die am PID 15 kultiviert worden waren, wurde nach 254 Tagen in Kultur, d.h. 180 Tage nach der letzten meßbaren Expression viraler Proteine (Abb. 27),

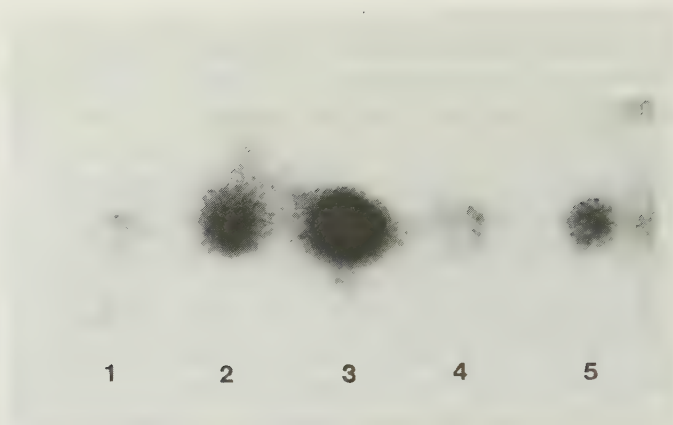


Abb. 31:

Hybridisierung von Gesamt-RNA aus Gehirn- und Lungengewebe von 6/94 ST-infizierten C129 Mäusen mehr als ein Jahr nach Infektion.

Gehirn und Lunge von 6/94 ST-infizierten und nicht-infizierten C129 Mäusen wurden 373 bzw. 423 Tage nach Infektion unter sterilen Bedingungen extrahiert und die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Nach Behandlung mit DNase (25 ug/ml, 30 min. 37°C) und Denaturierung mit Glyoxal wurden die RNA-Proben auf einen Nitrozellulose-Filter getropft. Der Filter wurde mit klonierter 6/94 ST-spezifischer, 32 P-nicktranslatierter W-DNA hybridisiert. Es wurden jeweils 2 ug Gesamt-RNA aufgetragen.

- 1: RNA aus dem Gehirn einer nicht-infizierten Kontroll-Maus extrahiert am PID 423.
- 2: RNA aus dem Gehirn einer Maus am PID 423, die mit 1×10^3 KID 6/94 ST infiziert worden war.
- 3: RNA aus dem Gehirn einer Maus am PID 423, die mit 5×10^5 KID 6/94 ST infiziert worden war.
- 4: RNA aus der Lunge einer nicht-infizierten Kontrollmaus am PID 373.
- 5: RNA aus der Lunge einer Maus am PID 373, die mit 1×10^3 KID 6/94 ST infiziert worden war.

cytoplasmatische RNA isoliert, gereinigt, mit DNase behandelt, nach Denaturierung mit Glyoxal an Nitrozellulose gebunden und mit ^{32}P -nicktranslatierter W- und E-DNA hybridisiert. Das Ergebnis (Abb. 29, 1) beweist auch hier das Vorhandensein viraler RNA-Sequenzen. In den Kontroll-Zellkulturen mit uninfizierten Gehirnzellen war keine virale RNA nachweisbar. Das bedeutet, daß die 6/94-RNA auch in vitro für mindestens 180 Tage in einer latenten Form ohne meßbare Proteinexpression in der Zelle vorhanden war.

Das Hybridisierungssignal der Abbildung 31 (3), das eine latente Infektion repräsentiert, ist bei identischer Expositionszeit und derselben, verwendeten Hybridisierungsprobe mit dem in Abbildung 22 (3b) vergleichbar. Im Kapitel 3.5.1. wurde angegeben, daß bei einer akuten Infektion etwa 2000 virale Genomäquivalente pro Zelle existieren. Weiterhin wurde bereits erwähnt, daß die Kopienzahl in persistent infizierten Zellen um den Faktor 200 niedriger liegt. Berücksichtigt man zusätzlich noch, daß beim Nachweis der latenten Infektion (Abb. 31, 3) nur etwa die Hälfte an Gesamt-RNA eingesetzt wurde, so ergibt sich, daß die latente Infektion mindestens um den Faktor 400 unter der für akute Infektionen definierten Kopienzahl liegt. Pro latent infizierte Zelle müßten demnach maximal 5 Kopien 6/94-Genom vorhanden sein. Es muß diskutiert werden, ob man annehmen kann, daß die 5 Kopien gleichmäßig in einer Zellpopulation verteilt sind, oder einzelne Zellen mehr und andere weniger virale RNA besitzen.

Zum Abschluß der Experimente sollte noch untersucht werden, ob die latente RNA die volle Genomlänge besitzt. Für eine mögliche Reaktivierung des Virus aus der Latenz und die möglicherweise damit verbundenen medizinischen Folgen ist es Voraussetzung, daß die latente RNA die komplette genetische Information des 6/94-Virus repräsentiert.

Aus den Gehirnzellen vom PID 15 wurden nach 300 Tagen in Kultur die Gesamt-RNA mit der Guanidinium-Rhodanid-Methode

isoliert und vor der Auftrennung im Agarosegel mit Glyoxal denaturiert. Als Längenstandard dienten Hind III-Fragmente von lambda-DNA. In der Abbildung 32, Spur 2 wurde 10 µg Gesamt-RNA aus den kokultivierten Mäuse-Gehirnzellen aufgetragen. Die ribosomale RNA dieser Zellen von 28S und 18S ist nach dem Färben mit Ethidiumbromid schwach sichtbar.

Um eine eventuell vorhandene 50S-RNA als Bande mit Ethidiumbromid-Färbung sichtbar zu machen, müssen aber mindestens 100 ng latente 50S-RNA vorhanden sein. Wird der Wert von 5 Kopien latenter RNA pro Zelle zu Grunde gelegt, läßt sich aus dem Molekulargewicht von 6/94-50S-RNA die entsprechende absolute RNA-Menge berechnen. 5 Kopien 50S-RNA entsprechen $4,2 \times 10^{-5}$ pg. Um latente RNA sichtbar zu machen, müßte die RNA demnach aus ca. 10^{10} Gehirnzellen isoliert werden, d.h. aus etwa 500 vollbewachsenen T 175 Zellkulturflaschen, wobei die großen Mengen an zellulärer RNA eine Auftrennung im Gel nicht mehr zuließen. Latente 50S-RNA kann also durch Färbung nicht sichtbar gemacht werden.

Andererseits erfolgt der Transfer hochmolekularer RNA auf Nitrozellulose für eine anschließende Hybridisierung nur mit geringer Effizienz, wie aus eigenen Versuchen ermittelt wurde. Ein Verlust durch den RNA-Transfer kann nicht in Kauf genommen werden. Deshalb wurde aus dem Gel (Abb. 32) der hochmolekulare Bereich um circa 15 kb ausgeschnitten, indem eine eventuell vorhandene 50S-RNA zu erwarten wäre. Die Nukleinsäure wurde aus der Agarose elektroeluiert und nach Glyoxal-Denaturierung auf Nitrozellulose getropft. Nach Hybridisierung mit 6/94-cDNA W ist auf der Autoradiographie dieses Dot Blots (Abb. 33, 1) bei der Konzentrierung der Nukleinsäuren auf einen kleinen Punkt und der langen Expositionszeit von 7 Tagen ein positives Hybridisierungssignal deutlich zu erkennen. Eine eventuell aufgetretene teilweise Degradation der RNA bei der Elution aus dem Agarosegel spielt für diese Hybridisierung keine Rolle. In der Kontrolle mit RNA aus nicht-infizierten Gehirnzellen sind keine viralen Sequenzen nachweisbar (Abb. 33, 2).

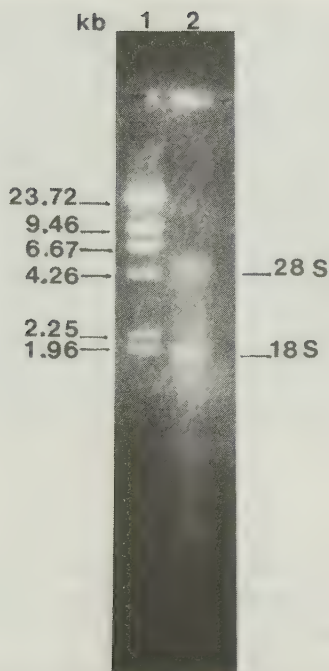


Abb. 32:

Gesamt-RNA aus latent 6/94-infizierten Mäusegehirn-Zellkulturen.

Die Gehirnzellen einer Maus, die mit 5×10^5 KID 6/94 ST infiziert worden war, wurden am PID 15 kokultiviert. Nach 300 Tagen in Kultur (46. Passage) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Nach Denaturierung mit Glyoxal wurde die RNA in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard dienten Hind III-Fragmente von lambda-DNA.

Spur 1: 2,5 µg lambda-DNA nach Restriktion mit Hind III.

Spur 2: 10 µg Gesamt-RNA aus kokultivierten, latent 6/94-infizierten Mäuse-Gehirnzellen.



Abb. 33:

Hybridisierung von hochmolekularer, latenter RNA aus 6/94-infizierten Mäuse-Gehirnzellen mit ^{32}P -nicktranslatierter Klon W-DNA.

Aus dem Agarosegel (Abb. 32) wurde in der Spur 2 der hochmolekulare Bereich um circa 15 kb ausgeschnitten und die RNA elektroeluiert. Nach Denaturierung mit Glyoxal wurde die RNA auf einen Nitrozellulose-Filter getropft und mit klonierter ^{32}P -nicktranslatierter 6/94-cDNA vom Klon W hybridisiert.

- 1: Hochmolekulare, latente RNA aus 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen, kokultiviert am PID 15, nach 300 Tagen in Kultur (46. Passage).
- 2: Als Negativkontrolle Gesamt-RNA aus Gehirn-Zellkulturen einer nicht-infizierten Kontroll-Maus, angelegt am PID 15, nach 300 Tagen in Kultur (46. Passage).
- 3: Als Positivkontrolle 10 ng cytoplasmatische RNA aus Gehirnzellen einer 6/94 ST-infizierten Maus (5×10^5 KID) in der akuten Infektionsphase (Kokultivierung am PID 15, nach 45 Tagen in Kultur, 7. Passage).

Damit konnte gezeigt werden, daß hochmolekulare RNA von circa 50S als latente RNA auch in den kultivierten Gehirnzellen der infizierten Mäuse vorlag. Es handelt sich bei der latenten RNA mit hoher Wahrscheinlichkeit um das ganze 6/94-Genom.

4. DISKUSSION

4.1. Klonierung genomischer cDNA des 6/94-Virus

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel des Paramyxovirus 6/94 Persistenz von Negativ-Strang-RNA-Viren zu untersuchen. Neben der schon für diese Viren gezeigten produktiv persistierenden Infektion wird auch die Existenz einer nicht-produktiven, persistierenden, d.h. latenten Infektion erwartet, da man Latenz bereits bei einigen anderen Viren kennt. Eine produktiv persistierende Infektion läßt sich an der Expression viraler Proteine verfolgen, während in einer nicht produktiven, latenten Infektion definitionsgemäß nur noch die virale Nukleinsäure meßbar wäre. Deshalb kann die Latenz viraler Nukleinsäure nur mit einer absolut virusspezifischen Hybridisierungsprobe eindeutig nachgewiesen werden, die durch Klonieren viraler cDNA erhalten werden kann. Die Klonierung genomischer, viraler cDNA erlaubt im Unterschied zu mRNA-Klonen zusätzlich das Studium der Genomorganisation des Virus. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit standen aber keine Klone genomischer RNA zur Verfügung. Im ersten Teil der Arbeit wurde deshalb die Klonierung genomischer, viraler cDNA durchgeführt.

Die Strategie, die zur Klonierung von cDNA des Paramyxovirus 6/94 gewählt wurde, unterscheidet sich von denen, die für Picornavirus-RNA (Nomoto et al. 1982; Küpper et al. 1982), für Influenzavirus-RNA (Lai et al. 1980) und für Masernvirus-mRNA (Rozenblatt et al. 1982) verwendet wurden. Als wichtige Reaktionen sind zu nennen:

1. An das 3'-Ende der ss cDNA mußte eine Poly(dC)-Kette angehängt werden, um die Doppelstrang-Synthese mit Oligo(dG) als Primer starten zu können.
2. Die Ligase-Bedingungen wurden so gewählt, daß eine Selektion auf die Klonierung langer Transkripte erfolgte.
3. Die Verwendung von lambda-Vektoren garantierte auf Grund der in vitro Verpackung eine ausreichende Klonierungseffi-

zienz auch bei geringen cDNA-Mengen.

Drei der erhaltenen Klone wurden untersucht. Die virale Spezifität wurde in verschiedenen Versuchen eindeutig gezeigt. Der stichhaltigste Beweis war die Hybridisierung der radioaktiv markierten Klon-DNA mit der Gesamt-RNA aus 6/94-infizierten Zellen im Vergleich zu RNA nicht-infizierter Zellen. Nach Abschluß der Experimente existierten noch keine Veröffentlichungen, in denen die Klonierung genomischer RNA von Paramyxoviren beschrieben wurde. Die Klone, E, W und C genannt, repräsentierten somit zunächst nicht nur die ersten 6/94-, sondern zu diesem Zeitpunkt auch die ersten Klone genomischer Paramyxovirus-RNA.

Hybridisierungsexperimente beweisen, daß die Klone W (1,3 kb) und C (1,4 kb), soweit sequenziert, identische Sequenzen enthalten, aber nicht im Klon E (6,9 kb) vorhanden sind. Additiv ergeben die Klone C und E mit 8,3 kb etwa die Hälfte des viralen Genoms. Das bedeutet, daß ein positives Hybridisierungssignal mit allen drei Klonen E, W und C anzeigen würde, daß ein beträchtlicher Teil des viralen Genoms in den infizierten Zellen vorhanden ist. Für den Nachweis viraler Nukleinsäure in infizierten Zellen ist eine genauere Charakterisierung der Klone nicht unbedingt nötig. Will man jedoch etwas über die Genomstruktur des 6/94-Virus erfahren, müssen die Klone zunächst den viralen Genen zugeordnet und die klonierte DNA näher analysiert werden.

4.1.1. Charakterisierung der 6/94-Klone

1983 erschien eine Arbeit über die Klonierung eines 3,3 kb großen Fragments vom 3'-Ende des Sendai-Genoms (Shioda et al. 1983). In diesem Bereich liegen die Struktur-Gene NP, P und das Nicht-Struktur-Gen C. Die Sequenzanalyse der 6/94-Klone ergab jedoch keine Übereinstimmung mit diesen klonierten Sendaivirus-Genen. Erst im Sommer 1984 veröffentlichten Gupta und Kingsbury die Anfangssequenzen aller Sendaivirus-mRNAs von jeweils rund

100 Nukleotiden und ermöglichten dadurch eine Zuordnung der 6/94-Klone W und C. Überraschenderweise ergab sich eine Übereinstimmung der bisher sequenzierten Bereiche der 6/94-Klone W und C mit dem Beginn des Sendaigens L, während zu den anderen bisher bekannten Sendaisequenzen keine Homologie besteht.

Somit ergeben sich drei Aussagen:

1. Die Klone W und C stammen aus demselben Genombereich. Der Grund dafür liegt möglicherweise im Vorhandensein eines für die Klonierung günstigen Hind III-Fragments der 6/94-cDNA.
2. Das L-Gen liegt am 5'-Ende der genomischen Negativ-Strang RNA (Abb. 20). Aus diesem Bereich stammen die Klone W und C. Daraus kann man ableiten, daß die Reverse Transkription wie geplant am experimentell synthetisierten 3'-Poly(A)-Ende des RNA-Templates mit Oligo(dT) als Primer startete und bis zum 5'-Ende reichte. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß bei Degradationen im Allgemeinen keine freien 3'-OH-Enden entstehen, die für die Polyadenylierung geeignet sind und zum Transkriptionsstart innerhalb des Genoms führen können. Außerdem konnte Neubert (1976) zeigen, daß ohne Polyadenylieren der Virus-RNA die cDNA-Synthese mit Oligo(dT) als Primer nicht abläuft. Das bedeutet, daß auch keine zu Oligo(dT) komplementären Sequenzen im 6/94-Genom existieren, an denen die Reverse Transkription starten könnte. Somit bestätigt sich das Ergebnis von Kapitel 3.2.3., in dem die 6/94-cDNA voller Genomlänge nachgewiesen worden war. Wenn die cDNA nicht das 5'-Ende erreicht hätte, wären Klone aus diesem Bereich, also vom L-Gen nicht zu erwarten gewesen. Der Bereich des L-Gens war bisher noch nicht kloniert worden. Außerdem wurde die Synthese von cDNA solcher Länge bisher noch nicht beschrieben. Vermutlich wurden aber die ursprünglich sehr langen cDNA-Kopien bei der Spaltung der Linkersequenzen mit Hind III auch intern von diesem Enzym geschnitten. Daraufhin deutet auch der Befund, daß alle klonierten Fragmente beidseitig keine Homopolymer-Ketten tragen, die zur Klonierung an die cDNA angehängt worden waren.

3. Es fällt auf, daß die für Sendai-RNA beschriebene L-Gen-Anfangssequenz (Gupta und Kingsbury 1984), die allerdings mit 129 Nukleotiden relativ kurz ist, bis auf zwei Basen mit dem sequenzierten Bereich der 6/94-Klone W und C identisch ist. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Region des L-Gens sehr konserviert ist. Da bekannt ist, daß bei persistierenden Infektionen mit Paramyxoviren in Zellkultur durchschnittlich 100 Mutationen pro Jahr und pro Molekül auftreten (Holland et al. 1979, 1982), kann einer derartig konservierten Region sicherlich eine besondere Bedeutung zugeschrieben werden. Gerade über das L-Gen der Sendaiviren ist aber noch sehr wenig bekannt. Es wird vermutet, daß dieses Protein einer Regulation auf Transkriptionsebene unterliegt und deshalb in geringeren Mengen als die übrigen viralen Strukturproteine produziert wird (Glazier et al. 1977). Das L-Gen ist sowohl auf Proteinebene wegen der geringen Ausbeute, als auch auf cDNA-Ebene wegen seiner Lage am 5'-Ende des Genoms schwierig zugänglich. Die erhaltenen 6/94-Klone eröffnen nun die Möglichkeit, die Organisation dieses Gens weiter zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den Klonen W und C konnte der Klon E bisher keinem bestimmten viralen Gen zugeordnet werden. Es kann aber von den Vergleichen mit den publizierten Teilen des Sendaivirus-Genoms her ausgeschlossen werden (Shioda et al. 1983; Gupta und Kingsbury 1982), daß der bisher sequenzierte Teil des Klons E zu den Genen NP, P, C und zu der 5'-Endsequenz des Genoms (Re et al. 1983 b) gehört (vgl. Abb. 20). Vom Klon E ist nur ein Ende sequenziert. Da in diesem Bereich in beiden Richtungen große Leserahmen liegen, was darauf hin deutet, daß die sequenzierte Region innerhalb eines Gens liegt, kann die Orientierung des Klons im viralen Genom noch nicht bestimmt werden. Da der Klon E nicht mit den Klonen W und C hybridisiert, also nicht den Anfang des L-Gens enthält, kann er entweder vor dem L-Gen (in 3'-Richtung), oder im L-Gen selbst (in 5'-Richtung) liegen (Abb. 20).

Zunächst wird der Fall diskutiert, daß der Klon E dem Bereich vor dem L-Gen zuzuordnen ist. Da der bisher sequenzierte Bereich des Klon E nicht mit den Genen NP, P und C homolog ist, könnte er in den Genen HN, F und M liegen.

Für den Fall, daß Klon E im L-Gen liegt, gelten folgende Überlegungen. Nimmt man das 6/94-Genom mit 15,5 kb an, so ergeben sich rechnerisch für das L-Gen 7,7 kb, da dieses Gen etwa 44% des Genoms ausmachen soll (Amesse et al. 1982). Da Klon E (6,9 kb) nicht mit W (1,3 kb) und C (1,4 kb) hybridisiert, die beide den Anfang des L-Gens enthalten, müßte sich das virale Genom vom L-Anfang ausgehend aber noch mindestens 8,3 kb in 5'-Richtung erstrecken. Da über die Länge des L-Gens noch keine eindeutigen Angaben existieren, ist diese Möglichkeit durchaus gegeben. Bisherige Angaben betreffen nur das L-Gen von Sendaivirus, und die Werte für 6/94-RNA könnten durchaus differieren.

Die Sequenzanalyse der 6/94-Klone lassen das Ergebnis der Hybridisierung dieser Klone mit 6/94-mRNA in einem anderen Licht erscheinen. Es war gefunden worden, daß die 6/94-Klone E, W und C mit den mRNAs der Gene P, HN, F₀, NP und M positive Hybridisierungssignale ergeben (Abb. 15, 16). Vor der Sequenzanalyse der 6/94-Klone war angenommen worden, die klonierten 6/94-Fragmente enthalten häufig im Genom vorkommende Sequenzen, ähnlich den von Shioda et al. (1983) sowie von Gupta und Kingsbury (1984) bereits beschriebenen. Zumindest für den Klon E, der wegen seiner Größe wahrscheinlich mehrere Gene und damit auch mehrere solcher Sequenzen enthält, ließe sich mit dieser Annahme die Hybridisierung mit den verschiedenen 6/94-mRNAs erklären. Schwieriger ist die Interpretation dieses unerwarteten Hybridisierungsergebnisses für die beiden Klone W und C, welche die L-Anfangssequenz repräsentieren. Das Hybridisierungsergebnis ließe sich dennoch erklären, wenn auch im Bereich des L-Gens Sequenzen lägen, die häufiger im viralen Genom vorkommen.

Da von den Klonen W und C durch die Sequenzanalyse nachgewiesen werden konnte, daß sie den Anfang des L-Gens repräsentieren, muß man erwarten, daß sie auch mit der mRNA des L-Gens ein positives Hybridisierungssignal ergeben, das im Northern Blot jedoch nicht vorhanden ist. Dieser Befund läßt sich dadurch erklären, daß auf dem analytischen Harnstoff-Gel ^3H -markierter 6/94-mRNA (Abb. 15) die Bande der L-mRNA nicht erkennbar ist. Die L-mRNA scheint in der Präparation nicht oder nur in sehr geringen Mengen vertreten zu sein. Deshalb kann auch im entsprechenden Northern Blot kein Hybridisierungssignal der L-mRNA erwartet werden.

Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß die erhaltenen Hybridisierungssignale gar nicht auf virale mRNA sondern auf mitgereinigte RNA von DI-Partikeln zurückzuführen ist, die in derselben Größenordnung wie die viralen mRNAs liegt. Für kleine Mengen mitgereinigter DI-RNA spricht auch die relativ geringe Intensität der Hybridisierungssignale. Daß DI-RNAs als definierte Banden von $0,4$ bis $1,4 \times 10^6$ d auftreten können, wurde beschrieben (Amesse et al. 1982; Re et al. 1983 a; Kolakofsky 1979). Da gerade die RNA defektiver Partikel bevorzugt L-spezifische Sequenzen (Lynch und Klakofsky 1978; Amesse et al. 1982) enthält, läßt sich auf diese Weise auch für die Klone W und C das erhaltene Ergebnis erklären.

4.1.2. Bedeutung des "inverted repeat" im Klon W

Man muß sich zunächst die Frage stellen, ob die "inverted repeat"-Sequenzen im Klon W ein Artefakt darstellen, das durch Ligation zweier cDNA-Fragmente bei der Klonierung erklärbar ist, oder ob es sich um eine echte Besonderheit im Genom des 6/94-Virus handelt. Immerhin wird beim verwandten "vesicular stomatitis virus" (VSV) von der Existenz eines "direct repeat" mit 80 und 50 Nukleotiden Länge berichtet (O'Hara et al. 1984).

Die Annahme, daß auf Grund der identischen Anfangs-

quenzen die Klone C und W aus dem selben Bereich des 6/94-Genoms stammen, ermöglicht es in Zukunft, dieser Frage nachzugehen. Findet sich nämlich der "inverted repeat" auch im entsprechenden, bisher nicht sequenzierten Bereich des Klons C ebenso wie im Klon W, so kann ausgeschlossen werden, daß es sich um ein Artefakt handelt. Denn es ist unwahrscheinlich, daß zweimal das gleiche zufällige Ligationsprodukt entstanden ist.

Ein Befund, der gegen die Annahme zu sprechen scheint, daß es sich bei dem "inverted repeat" um eine genomische Struktur handelt, liefert allerdings die Restriktion mit Hae III. Bei diesem Verdau ergeben sich für beide Klone unterschiedliche Schnittmuster (Abb. 14 und 18). Denkbar ist aber, daß die Unterschiede im Hae III-Schnittmuster auf sehr wenigen, mutierten Basenpaaren beruhen und die Sequenzen der beiden Klone bis auf diese Veränderungen identisch sind. Für eine abschließende Untersuchung müßten deshalb noch weitere Bereiche der klonierten cDNA sequenziert werden, die auch Aufschluß darüber geben könnten, wie weit die bisher gefundene Symmetrie im Klon W reicht.

Für Negativ-Strang RNA-Viren könnte diese Inversion eine besondere Bedeutung haben. Wird die virale mRNA translatiert, startet die Synthese am Anfang des Klons W und trifft dann nach etwa 1000 Nukleotiden auf Stoppsignale im "inverted repeat". Die Computer-Analyse der ermittelten 6/94-Sequenzen ergibt nämlich, daß in diesem Bereich nur in einer Richtung ein durchgehender Leserahmen vorhanden ist. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß die Anfangssequenz des Klons W nicht den Anfang des L-Gens darstellt, sondern der Transkriptionsstart für dieses Gen erst nach dem "inverted repeat" liegt (Abb. 34 a). Denkbar ist aber auch, daß der Bereich der Inversion nachträglich aus der mRNA "gespliced" wird (Abb. 34 b). Dann könnte die Anfangssequenz des Klons W doch den Start des Gen L darstellen. Von einem der beiden "inverted repeats" ausgehend (Abb. 34: IR2), könnte nun vom Negativ-Strang-Genom direkt ein virales Protein X

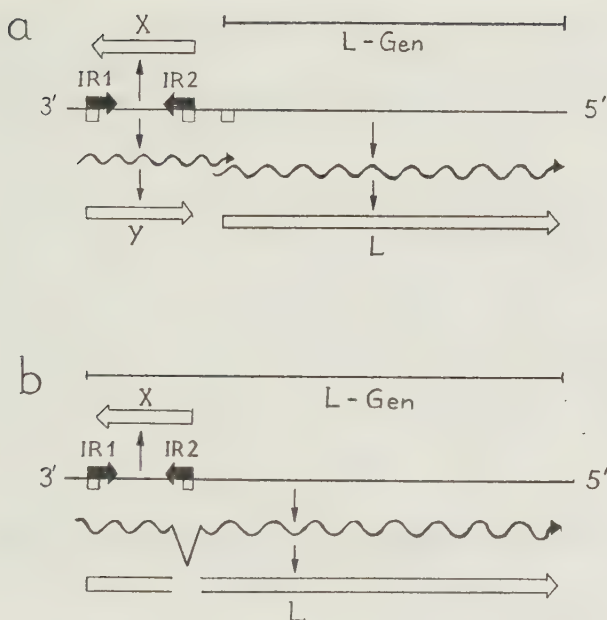


Abb. 34:

Modell zur Bedeutung des "inverted repeat".

Vom Bereich des L-Gens der Negativ-Strang-RNA des 6/94-Virus (mit 3'-5' gekennzeichnet) könnten mehrere, hypothetische Proteine (dicke, weiße Pfeile) kodiert sein. Die "inverted repeats" IR1 und IR2 (dicke, schwarze Pfeile) enthalten die Anfangssequenz des L-Gens (weiße Kästchen). In beiden Modellen a und b kann direkt von der Negativ-Strang-RNA ein virales Protein X synthetisiert werden. Wird der Bereich von IR1 ausgehend transkribiert, entsteht im Fall a eine mRNA, die zu einem verkürzten Protein Y führt, da die Translation in IR2 Stoppsignale findet. Da das L-Protein sehr groß ist, muß deshalb angenommen werden, daß der eigentliche Transkriptionsstart des L-Gens in 5'-Richtung von IR2 liegt. Im Fall b ist der L-Anfang mit IR1 identisch. Durch "splicing" wird aus der L-mRNA der Bereich des IR2 herausgeschnitten, wodurch die Translation des großen L-Proteins wieder möglich wird.

translatiert werden. Dieses hypothetische, verkürzte Protein könnte, wird die Länge des Klons W zu Grunde gelegt, immerhin aus etwa 400 Aminosäuren bestehen. Die Translation des Proteins X könnte in einem Fall (Abb. 34 b) eine regulatorische Rolle übernehmen. Vorstellbar ist, daß die Translation, welche von IR2 ausgeht, die bei IRL beginnende Transkription der L-mRNA sterisch behindert. Dadurch könnte die Transkription dieser mRNA und damit die Translation des L-Proteins gesteuert werden. Man hätte eine mögliche Erklärung für die Unterrepräsentation des L-Proteins in Proteinpräparationen aus viralen Partikeln oder 6/94-infizierten Zellen (Neubert, Fey, mündliche Mitteilung; Glazier et al. 1977).

4.2. Nachweis der 6/94-Infektion von Mäusen auf Proteinebene

4.2.1. Infektion mit 6/94 ST-Virus

Nach der Inokulation des 6/94 ST-Virus in C 129 Mäusen kam es zu einer akuten Infektionsphase, während der die Tiere einen erhöhten 6/94-spezifischen Antikörpertiter besaßen. Die Tiere zeigten kurz nach Infektion schwache Krankheitssymptome, welche als typische Anzeichen einer akuten Infektion gewertet werden können. Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen Mäuse mit der gleichen Dosis infiziert worden waren und 33% der Tiere starben (Gilden et al. 1976), überlebten in den hier beschriebenen Experimenten alle Tiere die Infektion. Eine Erklärung hierfür mag in einer längeren Adaptation des 6/94 ST-Virus in vielen aufeinanderfolgenden Ei-Passagen oder in einer Stabilisierung der Temperatursensitivität des Virus liegen.

Mehr als ein Jahr nach der Infektion zeigten die Tiere äußerlich keinerlei Krankheitssymptome mehr. Der Antikörpertiter der Tiere war unter die Nachweisgrenze gesunken und auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte keine Expression viraler Proteine mehr auf den Oberflächen

und im Cytoplasma der Gehirnzellen festgestellt werden. Diese Resultate können nun entweder auf eine latente Infektion hindeuten oder auf die Eliminierung des Virus aus den Tieren durch systemische Abwehrmechanismen.

Die mit den direkt an den Mäusegehirnen gemachten Beobachtungen ergaben sich in vergleichbarer Weise auch bei Langzeit-Kultivierung der Gehirnzellen infizierter Mäuse. Wurden die Gehirnzellen 15 Tage, also kurz nach Infektion der Tiere (PID 15), kokultiviert, so wurde eine Produktion infektiöser Viren induziert. Die Freisetzung der Viruspartikel setzte jedoch wider Erwarten erst verzögert, nach etwa zwei Wochen, ein. Das deutet darauf hin, daß dieser Prozeß zunächst durch eine noch ungeklärte Interaktion mit der Wirtszelle reprimiert wird, da erst durch die längere Kokultivierung virale Proteine exprimiert und 6/94-Viren freigesetzt wurden.

Im Überstand dieser PID 15 Gehirnzell-Kokulturen waren nach zwei Wochen in Kultur infektiöse Viren bis zur 13. Kultivierungswoche nachweisbar. Danach blieb das Ergebnis dieses Tests für die 6/94 ST-Infektion negativ. Mit 6/94-ST-Virus infizierte Zellen produzieren also 6/94-Viren nur für einen kurzen Zeitraum.

Nach Beendigung der Virusfreisetzung wurde wiederholt getestet, ob die Zellen vielleicht nur virale Proteine auf ihren Oberflächen exprimieren. Aber weder im HAD-Test, noch mittels der Immunfluoreszenz ließen sich virale Proteine in den Gehirn-Zellkulturen nachweisen. Ein signifikanter, cytopathischer Effekt wurde ebenfalls nicht beobachtet. Die Bemühungen, das Virus aus Zellen von PID 373 oder 423, also nach mehr als einem Jahr nach Infektion der Tiere, durch Kokultivierung zu reaktivieren, blieben dagegen erfolglos. Nach Ablauf der akuten Phase wurde weder in den Mäusen direkt, noch in den Mäusegehirn-Zellkulturen Expression viraler Proteine entdeckt. Eine Infektion mit 6/94 ST-Virus war also zu diesem Zeitpunkt sowohl in vivo wie in vitro auf

Proteinebene nicht nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß sich eine Virusfreisetzung nur in Zellkulturen auslösen läßt, die am PID 15, also in der frühen Infektionsphase der Tiere, angelegt wurden und auch dann nur für einen kurzen, begrenzten Zeitraum. Nach der akuten Phase konnten demnach auch in der Zellkultur mit den bisher üblichen Methoden Anzeichen für eine 6/94-Infektion auf Proteinebene nicht mehr entdeckt werden.

4.2.2. Infektion mit den 6/94-Virusvarianten

Wurden die Virusvarianten 6/94 cl* oder 6/94 co zur Infektion der Tiere verwendet, so ergab sich nach Kokultivierung der Gehirn-Zellkulturen ein anderer Infektionsverlauf als bei Infektion mit 6/94 ST-Viren. Die Infektion mit den Virusvarianten cl* und co, die aus persistierenden Infektionen stammen, blieb in den Mäusegehirn-Zellkulturen produktiv persistent. Über einen Zeitraum von etwa 9 Monaten wurde die permanente Freisetzung infektiöser Viruspartikel verfolgt. Es können demnach mit den 6/94-Varianten cl* und co, die aus produktiv persistierenden Infektionen stammen, wiederum nur produktiv persistierende, aber offensichtlich keine latenten Infektionen ausgelöst werden.

4.3. Nachweis der latenten, viralen Nukleinsäure in 6/94 ST-infizierten Mäuse-Gehirnzellen

Die fehlende Antigen-Produktion in den Gehirnzellen am PID 373 und 423 deutete zunächst auf eine Eliminierung des Virus aus den Tieren und den Gehirn-Zellkulturen hin. Angaben über eine nachträgliche Virusfreisetzung in zuvor antigenfreien Zellen (Wroblewska et al. 1976; ter Meulen et al. 1972), weisen jedoch darauf hin, daß die virale Information noch auf irgendeine Weise in den Gehirnzellen präsent sein könnte.

Aus der Zelllinie Cl-C-2, die sich wie die Cl-E-8-Zellen

aus einer Fusionierung der humanen Gehirnzellen der Multiple-Sklerose-Patienten abgeleitet (Tabelle 1), war das Virus offensichtlich eliminiert worden, da sich keine erneute Virusproduktion mehr durch Kokultivierung induzieren ließ, und da in Hybridisierungs-Experimenten mit viraler RNA keine virale Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte (Neubert und Hofschneider 1983). Obwohl, wie beschrieben, die virale RNA als Hybridisierungsprobe hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität kritisch beurteilt werden muß, kann vorerst angenommen werden, daß das Virus aus diesen Zellen eliminiert wurde.

Aus diesen Überlegungen heraus ergibt sich die Frage, ob im Verlauf der 6/94-Infektion das Virus auch aus den Gehirnzellen der infizierten Mäuse eliminiert worden war, wie im Fall der C1-C-2-Zellen, oder ob das 6/94-Virus noch in einer mit den bisherigen Methoden nicht nachweisbaren, latenten Form in den Gehirnzellen persistiert.

In einer latenten Infektion muß mindestens das virale Genom in den Wirtszellen vorhanden sein. Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht in dem Nachweis, daß 6/94-RNA in den Gehirnzellen infizierter C 129 Mäuse für mehr als ein Jahr, also nahezu ein Mäuseleben lang, existiert und daß somit eine latente Infektion auf molekularer Ebene nachgewiesen werden konnte. Dasselbe gilt für Gehirnzellen dieser Tiere, die in Kultur genommen wurden. Es hat sich gezeigt, daß auch nach mehreren Passagen die latente RNA in den Gehirnzell-Kulturen in etwa gleicher Kopienzahl erhalten bleibt. Da die Neuronen nicht teilungsfähig sind, kann man ausschließen, daß nur diese Zellen latent infiziert sind.

Die Anzahl viraler RNA-Kopien in den latent infizierten Zellen konnte größenordnungsmäßig auf etwa fünf Kopien pro Zelle bestimmt werden, also um den Faktor 400 niedriger als in akut infizierten Zellen. Gleichzeitig waren weder im HAD-Test, noch durch Immunfluoreszenz und ELISA virale

Proteine in den latent infizierten Zellen nachweisbar.

Zunächst soll das Ergebnis des ELISA diskutiert werden. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 200 pg an viralem Protein. Es stellt sich die Frage, ob diese Nachweisgrenze ausreichend gewesen wäre, um die Menge an viralem Protein, welche fünf Kopien viraler RNA entspricht, nachzuweisen. Dabei wird davon ausgegangen, daß für fünf virale RNA-Kopien intrazellulär das Strukturproteinäquivalent von fünf Viruspartikeln vorhanden ist. Da die Anzahl an Molekülen, die von den einzelnen Proteinen pro Virion vertreten ist und das Molekulargewicht der Proteine bekannt sind (Lamb et al. 1976), läßt sich berechnen, daß ein Virion insgesamt $7,1 \times 10^{-4}$ pg virales Protein enthält. Fünf Viruspartikel bestehen also aus $3,5 \times 10^{-3}$ pg Protein. Für den ELISA wurde 50 ug Gesamtprotein eingesetzt, was einer Anzahl von etwa $1,5 \times 10^5$ Gehirnzellen entspricht (Lukas mündliche Mitteilung). Enthält jede Zelle fünf Viruspartikel, so ist in 50 ug Gesamtprotein 531 pg virales Protein vorhanden. Diese Menge hätte im ELISA nachweisbar sein müssen. Daraus läßt sich schließen, daß die Produktion viraler Proteine in den Gehirnzellen von PID 373 und 423 blockiert oder zumindest stark reduziert ist und damit dem Nachweis im ELISA entgeht.

Die Frage, ob die 5 RNA-Kopien gleichmäßig in der Zellpopulation verteilt sind, oder wenige Zellen viele RNA-Kopien enthalten, muß diskutiert werden. Produzieren wenige Zellen virale Oberflächenantigene, würde eine latente Infektion nur vorgetäuscht werden. Solche Zellen wären aber im HAD-Test nachweisbar gewesen. Cytoplasmatische, virale Proteine hätte man zusätzlich mit der Immunfluoreszenz-Technik finden müssen. Sowohl in den Gehirnzellen direkt, als auch in den Gehirn-Zellkulturen konnte aber durch Hybridisierungsexperimente mit klonierten 6/94-cDNA-Fragmenten eindeutig virale RNA nachgewiesen werden. Da aber einzelne virusproduzierende Zellen im HAD-Test und in der Immunfluoreszenz an der Expression nachweisbar gewesen wären, kann ausgeschlossen werden, daß die Latenz dieser

viraler RNA durch solche wenigen Zellen vorgetäuscht wurde. Durch in situ Hybridisierung mit der klonierten 6/94-cDNA müßte sich diese Frage zukünftig klären lassen.

Da aus den bisherigen Ergebnissen geschlossen werden muß, daß die latente RNA repliziert wird, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Replikation. Denkbar ist, daß eine hypothetische, zelluläre RNA-abhängige RNA-Polymerase oder die RNA-Polymerase eines Helfervirus das 6/94-Genom repliziert. Wahrscheinlicher ist es, daß die 6/94-kodierte RNA-Polymerase in sehr geringer, bisher nicht nachweisbarer Menge translatiert wird und für die Replikation der RNA verantwortlich ist. Fraglich ist außerdem, auf welche Weise die virale RNA vor Degradationen geschützt ist. Naheliegend ist, daß auch in diesem Fall ein virales Protein, nämlich das NP, diese Aufgabe übernimmt. Die beiden Proteine P und NP würden für die Aufrechterhaltung der Latenz ausreichend sein. Würden in der latent infizierten Zelle nur diese beiden Proteine exprimiert werden, so berechnet sich die Menge an viralem Protein, die in den ELISA eingesetzt wurde, auf 195 pg für NP und 30 pg für P. Diese Werte liegen für das Protein NP schon im Bereich der Nachweisgrenze, für die virale Polymerase sicher unter dieser Grenze. Es erscheint also durchaus möglich, daß sich die Expression auf die viralen Proteine NP und P beschränkt und auf Grund der geringen Mengen mit den zur Verfügung stehenden Methoden der Nachweis dieser beiden Proteine nicht möglich ist. Gerade diese viralen Proteine entgehen auch dem empfindlichen Nachweis durch Hämadsorption, da sie keine Oberflächenproteine darstellen. Da die latente virale RNA die volle Genomlänge von 50S aufweist, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die komplette, virale Information vorhanden, die zu einer erneuten Virusfreisetzung notwendig wäre. Es konnte aber durch Kokultivierung aus den Mäusegehirnzellen keine Virusfreisetzung beobachtet werden. Die Isolierungsgeschichte des 6/94-Virus zeigt aber, daß eine Reaktivierung aus der Latenz durch Fusion der Gehirnzellen offenbar möglich war (ter Meulen et al. 1972). Das spricht dafür, daß keine

wesentlichen Mutationen im viralen Genom stattgefunden haben. Die Reaktivierung wird also eher von zellulären Mechanismen verhindert, welche die Expression viraler Proteine blockieren oder reprimieren könnten.

4.4. Histologische Untersuchungen der infizierten Mäusegehirne

Von Dr. J. Simon (MPI für Psychiatrie) wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit Gehirnschnitte der mit 6/94 ST-Virus infizierten Mäuse histologisch untersucht. In den Gehirnen der Mäuse in der akuten Phase, also in den ersten 2-3 Wochen nach Infektion, wurden perivaskuläre Infiltrate gefunden, die auf entzündliche Reaktionen hindeuten. Simon bezeichnet diese pathologischen Veränderungen als Symptome einer Meningoenzephalomyelitis. In dieser akuten Phase werden die endothelialen Zellen, welche die Gefäße im Gehirn auskleiden und denen die Funktion der Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben wird, sehr stark geschädigt und teilweise zerstört. Solche geschädigten Zellen zeigten im Gehirnschnitt auch eine deutliche 6/94-viruspezifische Immunfluoreszenz. Sie lassen sich deshalb mit der Virämie in Beziehung setzen, zumal sie mit dieser auch in enger zeitlicher Korrelation stehen.

In den Gehirnschnitten der Mäuse, die am PID 373 und 423 getötet wurden, stellte Simon zunächst keine auffallenden pathologischen Veränderungen fest. Später wurde aber durch Laminin- und Fibronektin-spezifische Immunfluoreszenz eine Veränderung an der Basalmembran der Endothelzellen entdeckt. Die morphologische Veränderung dieser Membran könnte auch zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke führen und damit zu einer Dysregulation des Stoffaustausches. Simon konnte jedenfalls zeigen, daß z.B. Dextran, das normalerweise von der Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten wird, aus dem Blut in den perivaskulären Raum eintreten kann (Simon et al. eingereicht). Da eine viruspezifische Immunfluoreszenz in den Gehirnschnitten dieser latent infizierten Mäuse aber

nicht nachgewiesen werden konnte, läßt sich zunächst kein Zusammenhang zwischen Infektion und pathologischen Veränderungen erkennen. Da jedoch in der frühen Phase der Infektion virale Antigene in endothelialen Zellen gefunden, und diese Zellen teilweise zerstört wurden, könnten die Veränderungen der endothelialen Zellen in der späten Infektionsphase eine Folge dieser Zellzerstörungen, und damit auf den Einfluß der 6/94-Viren zurückzuführen sein. Denkbar ist, daß in der akuten Phase die endothelialen Zellen auf ihren Oberflächen virale Antigene tragen, und vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Die dadurch entstehenden "Lücken" im Zellverband könnten Ausgangspunkte für die Veränderungen in der Blut-Hirn-Schranke darstellen, die in der späten Infektionsphase gefunden werden.

Kann virale Nukleinsäure in einigen Zellen latent überdauern und aus der Latenz durch noch unbekannte Faktoren reaktiviert werden, so würde sich der geschilderte Prozeß wiederholen. Dieses Modell würde erklären, wie es nach langer Zeit der Latenz wieder zum Ausbruch neurologischer Erkrankungen kommen kann.

4.5. Modell zur Latenz bei Paramyxoviren

Aus den bisherigen Ergebnissen und Überlegungen läßt sich am Beispiel von 6/94-Viren ein Modell aufstellen, wie es zur Latenz von Paramyxoviren kommen kann. Nach der Infektion mit 6/94-Viren erfolgt zunächst eine Virusfreisetzung und eine Immunantwort. Das Immunsystem eliminiert nun die freien Viren und diejenigen Zellen, welche virale Antigene auf ihren Oberflächen tragen. Zellen, die keine viralen Oberflächenproteine exprimieren, überleben die akute Infektionsphase, da sie vom Immunsystem nicht als infiziert erkannt werden. In diesen Zellen, in denen nur die viralen Proteine P und NP in geringen Mengen exprimiert werden, vermag die virale Information in Form latenter RNA, die von P repliziert und von NP vor Degradation geschützt wird, lange Zeit zu überdauern. In Folge der damit gewährleisteten

Replikation des viralen Genoms kommt es auch durch die Zellteilung nicht zur Ausverdünnung der viralen RNA. Durch unbekannte Faktoren könnte nunmehr auch nach sehr langen Zeiten, lokal oder systemisch, eine vorübergehende Umwandlung des latenten in einen akuten Zustand erfolgen, was klinisch zu intervallartig verlaufenden Krankheits-symptomen führen müßte.

In der vorliegenden Arbeit entwickelte keines der infizierten Tiere in der späten Infektionsphase auffallende Symptome einer Erkrankung des zentralen Nervensystems, weshalb angenommen werden kann, daß in der latenten Phase die Reaktivierung zu einer schnellen Virusreplikation einen Ausnahmefall darstellt. Vergleicht man die Anzahl der untersuchten 6/94-infizierten Mäuse mit dem Anteil von SSPE-Erkrankungen im Verhältnis zu Masern-infizierten Personen, kann nicht erwartet werden, daß in dem hier beschriebenen Tierexperiment das seltene Ereignis einer Reaktivierung des Virus gefunden werden kann.

Die Idee, den Mechanismus der viralen Latenz von RNA-Viren auf RNA-Ebene zu suchen, ist noch relativ neu. Noch vor fünf bis zehn Jahren war die Persistenz nur auf DNA-Ebene vorstellbar. Es wurde deshalb auch bei Paramyxoviren die Integration einer, mit Hilfe einer Reversen Transkriptase synthetisierten, viralen cDNA ins Genom postuliert. Da Paramyxoviren keine eigene Reverse Transkriptase besitzen, muß die Existenz einer zellulären Reversen Transkriptase vorausgesetzt werden, die bisher außer in embryonalem Gewebe (Mondal und Hofschneider 1982) nicht nachgewiesen werden konnte. Paramyxoviren vermögen aber auch in adultem Gewebe zu persistieren und die Synthese viraler cDNA ist deshalb nicht erklärbar. Der Nachweis latenter, viraler RNA macht diese Forderung unnötig und stellt für diese RNA-Viren einen einfacheren Mechanismus des Überdauerns viraler Information dar.

4.6. Mögliche Beziehung des 6/94-Virus zur Multiplen Sklerose

Eine Demyelinisierung wie sie für die pathologischen Läsionen bei der Multiple Sklerose typisch ist, wurde bei 6/94-Infektionen nicht beobachtet. Das 6/94-Virus wird heute auch als das im Sinne der Koch'schen Postulate alleinig auslösende Agens der Multiple Sklerose ausgeschlossen (Neubert 1979). Da die Reaktivierungsexperimente aber indirekt das Vorhandensein dieses Virus in den ursprünglichen, humanen Gehirnzellen der Multiple-Sklerose-Patienten zeigten (ter Meulen et al. 1972), könnte das 6/94-Virus bei einzelnen Patienten durchaus in Beziehung mit der Entstehung und Ausprägung der Krankheit stehen. Drei Möglichkeiten werden in Betracht gezogen:

1. Nach dem Modell von Simon könnte eine Veränderung der Blut-Hirn-Schranke direkt oder indirekt die Funktion verschiedener Zelltypen im Gehirn beeinträchtigen. Werden beispielsweise die Oligodendrozyten, die das Myelin produzieren, in Mitleidenschaft gezogen, kann vermutet werden, daß es dadurch zu einer Demyelinisierung kommen kann.
2. In Zellmembranen eingelagerte Virusproteine könnten eine cytotoxische Reaktion des Immunsystems verursachen und damit zur Eliminierung dieser Zellen führen. Im Allgemeinen können solche Zellen ersetzt werden. Eine Ausnahme bilden aber die hochdifferenzierten Neuronen. Es ist deshalb vorstellbar, daß es auf diese Weise zu beträchtlichen Läsionen kommen kann, die auch zu den bekannten Lähmungserscheinungen im Verlauf der Multiplen Sklerose führen.
3. In der latenten Infektionsphase könnte es bei Reaktivierung nach dem geschilderten Modell (Kapitel 4.4.) zu Krankheitsschüben, wie sie von der Multiplen Sklerose bekannt sind, kommen.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, daß es sich hierbei nur um Hypothesen handelt. Die komplizierten Interaktionen von Virus- und Wirtszelle und die Präsenz

eines latenten, aber reaktivierbaren Virus könnte jedoch in vieler Hinsicht im Zusammenhang mit einer solchen Krankheit stehen.

Ein viraler Beitrag zur Entstehung von chronischen ZNS-Erkrankungen wird in heute modernen Modellsystemen oft nicht hinreichend berücksichtigt. So arbeitet Meyermann (mündliche Mitteilung) an einem System, bei dem die Wirkung basischen Myelins als Antigen auf Gehirnzellen von Ratten untersucht wird. Dieses Gehirnprotein ruft pathologische Veränderungen hervor, die zum Teil der Multiple Sklerose ähneln, wenn eine Demyelinisierung auch nicht beobachtet wird. Es handelt sich hierbei um Kurzzeitexperimente, bei denen die Tiere wenige Stunden bis einige Tage nach Inokulation des Proteins getötet und histologisch untersucht werden. Das basische Myelin wirkt offensichtlich direkt toxisch auf die Zellen und wird vom Organismus abgebaut. Es handelt sich also um ein sehr einfaches, nicht replikationsfähiges System. Für die Erforschung der Ursachen einer Langzeit-Persistenz von Viren, die in Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen stehen könnten, sollten jedoch Systeme, wie das 6/94-Modell, geeigneter sein, die auch die Abläufe im Entstehungsbereich einer Krankheit soweit wie möglich widerspiegeln.

5. LITERATUR

- Amesse, L.S. & Kingsbury, D.W. (1982) Sendai virus sequences identified by oligonucleotide mapping. *Virology* 118: 8-16.
- Amesse, L.S., Pridgen, C.L. & Kingsbury, D.W. (1982) Sendai virus DI RNA species with conserved virus genome termini and extensive internal deletions. *Virology* 118: 17-27.
- Appleyard, R.K. (1954) Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39: 440-.
- Baczko, K., Billeter, M. & ter Meulen, V. (1983) Purification and molecular weight determination of measles virus genomic RNA. *J. gen. Virol.* 64: 1409-1413.
- Benton, W.D. & Davis, R.W. (1977) Screening of recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Blumberg, B.M., Rose, K., Simona, M.G., Roux, L., Giorgi, C. & Kolakofsky, D. (1984) Analysis of the Sendai virus M gene and protein. *J. Virol.* 52: 656-663.
- Bogen, C., Gilden, D.H., Wroblewska, Z. & Wolinsky, J.S. (1977) Experimental infection of human leucocytes with parainfluenza 1 (6/94) virus. *Infec. Immun.* 18: 501-508.
- Bollum, F. J. (1974) Terminal deoxynucleotidyl transferase. *The Enzymes* 10: 145-.

- Brahic, M., Stowring, L., Ventura, P. & Haase, A.T. (1981) Gene expression in visna virus infection. *Nature* 289: 447-450.
- Brüssow, H. (1983) Versuche zum Mechanismus der viralen Persistenz in Zellen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Cabrere, C.V., Wohlenberg, C., Openshaw, H., Ray-Mendez, M., Puga, A. & Notkins, A.L. (1980) Herpes simplex virus DNA sequences in the CNS of latently infected mice. *Nature* 288: 288-290.
- Chanock, R.M. & Johnson, K.M. (1964) Parainfluenza Viruses. In: Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases, American Public Health Association, New York, pp. 470-486.
- Childs, R.E. & Bardsley, W.G. (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145: 93-103.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. & Rutter, W. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources. *Biochemistry* 18 (24): 5294-5299.
- Choppin, P.W. (1981) Isolation of paramyxoviruses from patients with chronic neurologic diseases. *J. Infect. Dis.* 143: 501-503.
- Choppin, P.W. & Compans, R.W. (1975) Reproduction of Paramyxovirions, In: Frankel-Conrat, H. & Wagner, R.R. (Hrsg.), *Comprehensive Virology*, Vol. IV, pp. 95, Plenum Press, New York.

- Choppin, P.W., Richardson, C.D., Merz, D.C., Hall, W.W. & Scheid, A. (1981) The functions and inhibition of the membrane glycoproteins of paramyxoviruses and myxoviruses and the role of the measles virus M protein in subacute sclerosing panencephalitis. *J. Inf. Dis.* 143: 352-363.
- Collins, A.R. & Flanagan, T.D. (1977) Interferon production and response to exogenous interferon in two cell lines of mouse brain origin persistently infected with Sendai virus. *Arch. Virol.* 53: 313-321.
- Crowther, J.R. & Abu-el Zein, E.M.E. (1979) Detection and quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques. *J. gen. Virol.* 42: 597-602.
- Dayhoff, M.D., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acid sequence database. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. *DNA* 1 (1): 51-58.
- Denhardt, D.T. (1966) A membran-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 641-646.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acid. Res.* 12: 387-395.
- Dougherty, R.M. & DiStefano, H.S. (1966) Lack of relationship between infection with avian leukosis virus and the presence of COFAL antigen in chick embryos. *Virology* 29: 586-595.
- Dowling, P.C., Giorgi, C., Roux, L., Dethlefsen, L.A., Galantowicz, M.E., Blumberg, B.M. & Kolakofsky, D. (1983) Molecular cloning of the 3'-proximal third of Sendai virus genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 5213-5216.

- Dugaiczyk, A., Boyer, H. & Goodman, H. (1975) Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96: 171-184.
- Efstratiadis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.M. & Maniatis, T. (1976) Enzymatic in vitro synthesis of globin genes. *Cell* 7: 279-.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *J. Immunol.* 109: 129-135.
- Enquist, L. & Sternberg, N. (1979) In vitro packaging of lambda Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. *Meth. Enzymol.* 68: 281-298.
- Evans, A.S. (Hrsg.) (1984) *Viral Infections of Humans*, Plenum Medical Book Company, New York & London.
- Friedmann, E.Y. & Rosbach, M. (1977) The synthesis of high yields of full-length reverse transcripts of globin mRNA. *Nucl. Acids Res.* 4: 3455-3455.
- Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B.A. (1979) Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature* 279: 529-530.
- Georges, J.C. (1981) Les fonctions biologique des differents polypeptides constitutifs des paramyxovirus. *Bull. Inst. Pasteur* 79: 3-78.
- Gilden, D.H., Wroblewska, Z., Chesler, M., Wellish, M.C., Lief, F.S., Wolinsky, J.S. & Rorke, L.B. (1976) Experimental panencephalitis induced in suckling mice by parainfluenza type I (6/94) virus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 35: 259-270.
- Gilden, D., Rorke, L.B., Wroblewska, Z. & Wellish, B.S. (1978) Parainfluenza 1 (6/94) virus-induced white matter

degeneration: Enhancement by adoptive transfer of virus-sensitized immunocytes. *Neurology* 28: 1004-1007.

Glazier, K.R., Raghow, R. & Kingsbury, D.W. (1977) Regulation of Sendai virus transcription: Evidence for a single promotor in vivo. *J. Virol.* 21: 863-.

Good, R.A. & Campbell, B. (1945) Potentiating effect of anaphylactic and histamine shock upon herpes simplex virus infection in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 59: 305-306.

Gorecki, M. & Rozenblatt, S. (1980) Cloning of DNA complementary to the measles virus mRNA encoding nucleocapsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3686-3690.

Gupta, K.C. & Kingsbury, D.W. (1982) Conserved polyadenylation signals in two negative-strand RNA virus families. *Virology* 120: 518-523.

Gupta, K.C. & Kingsbury, D.W. (1984) Complete sequence of the intergenic and mRNA start signals in the Sendai virus genome: Homologies with the genome of vesicular stomatitis virus. *Nucl. Acids Res.* 9: 3829-3841.

Gupta, K.C., Morgan, E.M., Kitchingman, G. & kingsbury, D.W. (1983) Molecular clones representing Sendai virus genes P, NP und M. *J. gen. Virol.* 64: 1679-1688.

Haase, A.T., Ventura, P., Gibbs, C.J. Jr. & Tourtellotte, W.W. (1981) Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization in situ. *Science* 212: 672-675.

Hall, W.W., Lamb, R.A. & Choppin, P.W. (1979) Measles and SSPE virus proteins; lack of antibodies to the M protein in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2047-2051.

- Hohn, B. (1979) In vitro packaging of lambda and cosmid DNA. Meth. Enzymol. 68: 299-309.
- Holland, J.J., Grabau, E.A., Jones, C.L. & Semler, B.L. (1979) Evolution of multiple genome mutations during long-term persistent infection by vesicular stomatitis virus. Cell 16: 495-504.
- Holland, J.K., Spindler, F., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. & VandePol, S. (1982) Rapid evolution of RNA genomes. Science 215: 1577-1585.
- Holland, M. & Levine, A. (1978) Mechanism of viral persistence. Cell 14: 447-452.
- Homma, M. (1971) Trypsin action on growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration of the infectivity for L-cells by direct action of trypsin on L-cell-borne Sendai virus. J. Virol. 8: 619-629.
- Homma, M. (1972) Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. II. Restoration of the hemolytic activity of L-cell-borne Sendai virus by trypsin. J. Virol. 9: 829-835.
- Horwitz, J.P. (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. J. Med. Chem. 7: 574-.
- Huang, A.S. (1973) Defective interfering viruses. Ann. Rev. Microbiol. 27: 101-117.
- Hönig, I. (1983) Analyse der Fusions (F-)proteine der in ihrer Infektiosität veränderten Sendai (6/94-) Viren aus Fusionszellen. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Ishida, N. & Homma, M. (1960) . Tohoku J. Exp. Med. 73:

56-69.

Ishida, N. & Homma, M. (1961) Host-controlled variation observed with Sendai virus grown in mouse fibroblast (L-) cells. *Virology* 14: 486-488.

Ishida, N. & Homma, M. (1978) Sendai virus. *Advances in Virus Research* 23: 349-383.

Ito, Y., Kimura, Y., Nagata, I. & Kunii, A. (1974) Production of interferon like substance by mouse spleen cells through contact with BHK cells persistently infected with HVJ. *Virology* 60: 73-89.

Ivanovski, D.I. (1892) On two diseases of tobacco. *Sel'. Khoz. Lesov.* 169: 108-121.

Jacob, F. & Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.

Joseph, B.S. & Oldstone, M.B. (1975) Immunologic injury in measles virus infection. II. Suppression of immune injury through antigenic modulation. *J. Exp. Med.* 142: 864-876.

Kanda, T. & Shibuta, H. (1981) A temperature sensitive mutant of Sendai virus which establishes persistent infection in Vero cells without cell crisis. *Virology* 108: 318-324.

Kimura, Y. (1979) Tryptic peptide analysis of the structural proteins of a temperature-sensitive mutant derived from an HVJ (Sendai virus) carrier culture. *Arch. Virol.* 61: 157-161.

Kingsbury, D.T. & Lerner, R.A. (1974) Encapsulation of Lymphocyte DNA by vesicular stomatitis virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1753-1757.

- Kingsbury, D.W. (1972) Paramyxovirus replication. *Curr. T. Micr.* 59: 1-32.
- Kingsbury, D.W. & Portner, A. (1970) On the genesis of incomplete Sendai virions. *Virlogy* 42: 872-879.
- Kingsbury, D.W., Portner, A. & Darlington, R.W. (1970) Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNAs. *Virology* 42: 857-871.
- Kirby, K.S. (1968) Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.* 96: 265-266.
- Kolakofsky, D. (1979) Studies on the generation and amplification of Sendai virus defective-interfering genomes. *Virology* 93: 589-593.
- Kolakofsky, D., Spahr, P.F. & Koprowski, H. (1974 a) Comparision of 6/94 virus and Sendai virus RNA by RNA-RNA hybridization. *J. Virol.* 13: 935-936.
- Koprowski, H. (1952) Latent or dormant viral infections. In: *Viruses as causative agents of cancer.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 54: 963-976.
- Koprowski, H. (1971) Cell fusion and virus rescue. *Federation Proceedings* 30: 914-920.
- Koprowski, H. (1982) Unlearning about latency. *Med. Microbiol. Immunol.* 170: 209-219.
- Koprowski, H. & ter Meulen, V. (1975) Multiple sclerosis and parainfluenza-1 virus. *J. Neurol.* 208: 175-190.
- Küpper, H., Keller, W., Kurz, Ch., Forss, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V.G. & Hofschneider, P.H. (1981) Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in

E. coli. Nature 289: 555-559.

Lai, Ch., Markoff, L.J., Zimmerman, S., Cohen, B., Behrendt, J.A. & Chanock, R.M. (1980) Cloning DNA sequences from influenza viral RNA segments. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77: 210-214.

Lamb, R.A., Maky, B.W.J. & Choppin, P.W. (1976) The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. Virology 69: 116-131.

Lewandowski, L.J., Lief, F.S., Verini, M.A., Pienowski, M., ter Meulen, V. & Koprowski, H. (1974) Analysis of a viral agent isolated from multiple sclerosis brain tissue. J. Virol. 13: 1037-1045.

Lewandowski, L.J., Gerhard, W.U. & Palmer, J.C. (1976) Cell-mediated cytotoxicity against murine cells infected with 6/94 virus, a parainfluenza type I isolated from multiple sclerosis brain tissue. Infect. Immun. 13: 712-721.

Lief, F.S., Loh, W., ter Meulen, V. & Koprowski, H. (1975) Antigenetic variation among parainfluenza type 1 (Sendai) viruses: Analysis of 6/94 virus. Intervirology 5: 1-9.

Lief, F.S., Rorke, L.B., Kalter, S.S., Hoffman, S.F., Roosa, R.A., Moore, G.T., Cummins, L.B., McMullough, B., Rodriguez, A.R., Eichberg, J. & Koprowski, H. (1976) Infection and disease induced in chimpanzees with 6/94, a parainfluenza type I virus isolated from human multiple sclerosis brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 35: 644-664.

Loeffler, F. & Frosch, P. (1897) Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. Zentbl. Bakt. ParasitKde. Abt.I 23: 257-259.

- Lynch, S. & Kolakofsky, D. (1978) Ends of the RNA within Sendai virus defective interfering nucleocapsids are not free. *J. Virol.* 28: 584-589.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (Hrsg.) (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical changes. *Meth. Enzymol.* 65: 499-559.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. & Wittmann, G. (1974) *Virologische Arbeitsmethoden*, Bd. 1, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Mayr, A., Bachman, P.A., Bibrack, B. & Wittman, G. (1977) *Virologische Arbeitsmethoden*, Bd. 2, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- McMaster, G.K. & Carmichael, G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Biochemistry* 16: 4835-4838.
- Mondal, H. & Hofschneider, P.H. (1982) Isolation and characterization of retrovirus-like elements from normal human fetuses. *Int. J. Cancer* 30: 281-287.
- Murray, N.E., Brammer, W.J. & Murray, K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150: 53-61.
- Myers, J.C., Ramirez, F., Kacian, D.L., Flood, M. & Spiegelman, S. (1980) A simple purification of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase for full-length transcription of 35S RNA. *Anal. Biochem.* 101: 88-.

- Neubert, W. (1976) Reverse Transkription der RNA des Paramyxovirus 6/94 in vitro. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Neubert, W. (1979) Versuche zum Mechanismus der viralen Persistenz in Zellen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Neubert, W.J. & Hofschneider, P.H. (1983) Transient rescue of Sendai-6/94 c1 virus from the persistently infected cell line Cl-E-8 by cocultivation. *Virology* 125: 445-453.
- Neubert, W.J., Hofschneider, P.H. & Koprowski, H. (1983) Search for Sendai 6/94 viral RNA in the antigen-free cell line Cl-C-2 isolated from human multiple sclerosis brain tissue. *Infect. Immun.* : 675-682.
- Nomoto, A., Toyoda, H., Imura, N., Noguchi, S. & Seiya, T. (1982) Restriction map of double-stranded DNA copy synthesized from poliovirus Sabin 1 RNA. *J. Biochem.* 91: 1593-1600.
- O'Hara, P.J., Nichol, S.T., Horodyski, F.M. & Holland, J.J. (1984) Vesicular stomatitis virus defective interfering particles can contain extensive genomic sequence rearrangements and base substitutions. *Cell* 36: 915-924.
- Ohuchi, M. & Homma, M. (1976) Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. IV. Evidence for activation of Sendai virus. *J. Virol.* 18: 1147-1150.
- Openshaw, H., Sekizawa, T., Wohlenberg, C. & Notkins, A.L. (1981) The role of immunity in latency and reactivation of herpes simplex viruses, Elsevier, North Holland New York.
- Payne, L.N. & Chubb, R.C. (1968) Studies on the nature and genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFAL test. *J. Gen. Virol.* 3: 379-391.

- Puga, A., Rosenthal, J.D., Openshaw, H. & Notkins, A.L. (1978) Herpes simplex virus DNA and mRNA sequences in acutely and chronically infected trigeminal ganglia of mice. *Virology* 89: 102-111.
- Re, G.G., Gupta, K.C. & Kingsbury, D.W. (1983 b) Sequence of the 5'end of the Sendai virus genome and its variable representation in complementary form at the 3'ends of copy-back defective interfering RNA species: Identification of the L gene terminus. *Virology* 130: 390-396.
- Re, G.G., Gupta, K.C. & Kingsbury, D.W. (1983 a) Genomic and copy-back 3' termini in Sendai virus defective interfering RNA species. *J. Virol.* 45 no. 2: 659-664.
- Reed, W. & Carroll, J. (1902) The ethiology of yellow fever. *Am. Med.* 3: 301-305.
- Retzel, E.F., Collet, M.S. & Faras, A.J. (1980) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase in vitro: Optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. *Biochemistry* 19: 513-.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M.A., Rhodes, C. & Berg, P.J. (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- Rorke, L.B., Gilden, D.H., Wroblewska, Z. & Wolinski, J.S. (1976) Experimental panencephalitis induced in suckling mice by parainfluenza type 1 (6/94) virus. *J. Neuropath. Exp. Neur.* 35: 247-258.
- Rougeon, F. & Mach, B. (1976) Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 3418-.

Rous, P. (1911) Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate. J. Am. Med. Ass. 56: 198-.

Roux, L. & Holland, J.J. (1979) Role of defective interfering particles of Sendai virus in persistent infections. Virology 93: 91-103.

Roux, L. & Waldvogel, F.A. (1982) Instability of the viral M protein in BHK-21 cells persistently infected with Sendai virus. Cell 28: 293-302.

Roychoudhury, R.E., Jay, E. & Wu, R. (1976) Terminal labelling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nucl. Acids Res. 3: 101-101.

Rozenblatt, S., Gesang, C., Lavie, V. & Neumann, F.S. (1982) Cloning and characterization of DNA complementary to the measles virus mRNA encoding hemagglutinin and matrix protein. J. Virol. 42: 790-797.

Scheid, A. & Choppin, P.W. (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. Virology 57: 475-490.

Scheid, A. & Choppin, P.W. (1976) Protease activation mutants of Sendai virus. Virology 69: 265-277.

Scheid, A., Graves, M.C., Silver, S.M. & Choppin, P.W. (1978) Studies on the structure and functions of paramyxovirus glycoproteins. In: Negative Strand Viruses and the Host Cell I, Academic Press, New York.

Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A.D. & Itakus, K. (1977) Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning. Science 196: 177-.

- Sekizawa, T., Openshaw, H., Wohlenberg, C. & Notkins, A.L. (1980) Latency of herpes simplex virus in absence of neutralizing antibody: model for reactivation. *Science* 210: 1026-1028.
- Shibuta, H., Kanda, T., Adachi, A. & Yogo, Y. (1979) Characterization of bovine parainfluenza virus type 3. *Microbiol. Immunol.* 23: 617-628.
- Shimizu, K., Shimizu, Y.K., Kohama, T. & Ishida, N. (1974) Isolation and characterization of two distinct types of HVJ (Sendai virus) spikes. *Virology* 62: 90-101.
- Shioda, T., Hidaka, K., Shibuta, H., Nomoto, A. & Iwasaki, K. (1983) Sequence of 3,687 nucleotides from the 3'end of Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequences of viral NP, P and C proteins. *Nucl. Acids Res.* 11: 7317-7330.
- Simpson, R.W. & Iinuma, M. (1975) Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3230-3234.
- Sippel, A.E. (1973) Purification and characterization of adenosin triphosphate: Ribonucleic acid adenyltransferase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 37: 31-40.
- Soberon, X., Covarrubias, L. & Bolivar, F. (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles. Deletion derivatives of pBR 322 and pBR 325. *Gene* 9: 287-305.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sugino, A., Goodman, H.M., Heyneker, H.L., Shine, J., Boyer,

- H.W. & Cozzarelli, N.R. (1977) Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends. *J. Biol. Chem.* 252: 3987-.
- Sugita, K., Maru, M. & Satu, K. (1974) A sensitive plaque assay for Sendai virus in an established line of monkey kidney cells. *Jap. J. Microbiol.* 18: 262-264.
- Takeyama, H., Kawashima, K., Yamada, K. & Ito, Y. (1979) Induction of tumor resistance in mice by L1210 leukemia cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *Gann* 70: 493-501.
- Ter Meulen, V., Koprowski, H., Iwasaki, Y., Kaechell, Y.M. & Mueller, D. (1972) Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells. Presence of nucleocapsides and virions and isolation of parainfluenza type virus. *Lancet* 2: 1-5.
- Thomas, P. (1980) Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205.
- Traub, E. (1936) Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity. *J. Exp. Med.* 63: 847-.
- Truant, A.L. & Hallum, J.V. (1977) A persistent infection of baby hamster kidney-21 cells with mumps virus and the role of temperature-sensitive variants. *J. Med. Virol.* 1: 49-67.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. & Goodman, H.M. (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196: 1313-1318.
- Verini, M.A. & Lief, F.S. (1979 a) Interaction between 6/94

- virus, a parainfluenza type 1 strain, and mouse macrophages. *Infect. Immun.* 24 (3): 720-728.
- Verini, M.A. & Lief, F.S. (1979 b) Interaction between 6/94 virus, a parainfluenza type 1 strain, and unstimulated mouse lymphocytes. *Infect. Immun.* 24 (3): 729-733.
- Verini, M.A. & Lief, F.S. (1979 c) Interaction between 6/94 virus, a parainfluenza type 1 strain, and human leukocytes. *Infect. Immun.* 24 (3): 734-741.
- Vogt, V.M. (1973) Purification and further properties of single strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Bioch.* 33: 192-200.
- Vogt, V.M. (1980) Purification and properties of S1 nuclease from *Aspergillus*. *Meth. Enzymol.* 65: 248-255.
- Volkert, M., Bro-Jørgensen, K. & Marker, O. (1975) Persistent LCM infection in the mouse. Immunity and tolerance. *Bull. WHO* 52: 471-478.
- Waters, D.J., Koprowski, H. & Lewandowski, L.J. (1974) Parainfluenza-1 virus and multiple sclerosis: The conversion of 6/94 virus released from human brain cells and other mammalian cells into an infectious form by passage in macrophages. *Med. Microb. Immunol.* 160: 235-246.
- Weiner, L.P. & Johnson, R.T. (1977) Virus-host cell interactions in slow virus diseases of the nervous system, Amsterdam, Elsevier, North-Holland.
- Weiss, R. (1977) Persistent infections without proviral DNA. *Nature* 265: 295-296.
- Wertz, G.W. & Davis, N.L. (1979) RNase III cleaves vesicular stomatitis virus genome-length RNAs but fails

to cleave viral mRNAs. J. Virol. 30: 108-115.

Wertz, G.W., Davis, N.L. & Edgell, M.H. (1980) High resolution preparative gel electrophoresis: Separation and recovery of functional messenger RNA species. Anal. Biochem. 106: 148-155.

Wiegand, R.C., Godson, G.N. & Radding, C.M. (1975) Specificity of the S1 nuclease from *Aspergillus oryzae*. J. Biol. Chem. 250: 8848-.

Wolinsky, J.S., Gilden, D.H. & Rorke, L.B. (1976) Experimental panencephalitis induced in suckling mice by parainfluenza 1 (6/94) virus. J. Neuropath. Exp. Neurol. 35: 271-286.

Wroblewska, Z., Santoli, D., Gilden, D., Lewandowski, L. & Koprowski, H. (1976) Persistent parainfluenza type I (6/94) infection of brain cells in tissue culture. Arch. Virol. 50: 287-303.

Wroblewska, Z., Wellish, M., Rorke, L.B. & Gilden, D.H. (1978) Rat tracheal organ culture supports replication of parainfluenza 1 (6/94) virus and promotes 6/94 virus rescue from latently infected human brain cells. J. Med. Virol. 3: 111-118.

Young, R.C.-A., Lis, J. & Wu, R. (1979) Elution of DNA from gels after electrophoresis. Meth. Enzymol. 68: 176-.

Zgorniak-Nowosielska, I., Iwasaki, Y., Tachovsky, T., Tanaka, R. & Koprowski, H. (1976) Experimental parainfluenza type 1 virus-induced encephalopathy in adult mice. Arch. Neurol. 33: 55-62.

Zhdanov, V.M. (1976) Integration of genomes of infectious RNA viruses. Intervirolo. 6: 129-132.

Zhdanov, V.M. & Parfanovich, M.J. (1974) Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome. Arch. ges. Virusforsch. 45: 225-234.

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cpm	Impulse pro Minute
CTAB	Cethylmethyllammoniumbromid
d	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
ss	einzelsträngig
DTE	Dithioerythrit
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HAH	Hämagglutinationshemmung
HAD	Hämadsorption
KID	Kulturinfektionsdosis
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
Md	Megadalton
mM	Millimolar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
um	Mikrometer
nm	Nanometer

UWGCG	University of Wisconsin Genetics Computer Group
O.D.	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge in nm
PEG	Polyäthylenglykol
pfu	plaque forming units
PVP	Polyvinylpyrrolidon
^{32}P	radioaktives Isotop von Phosphor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
TCA	Trichloressigsäure
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit (unit)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider danke ich für sein großes Interesse an dieser Arbeit und die damit verbundene Förderung.

Herrn Professor Dr. Horst Schmieger danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter der Arbeitsgruppe Dr. Wolfgang Neubert für seine vielen wertvollen Ratschläge, seine freundliche Anteilnahme und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Jiri Simon (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) bin ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den histologischen Untersuchungen zu großem Dank verpflichtet.

Frl. Christine Baumann danke ich herzlich für die engagierte, technische Hilfe bei vielen Experimenten.

Für die Durchführung der DNA-Sequenzierung möchte ich mich bei Frl. Christine Schmidt bedanken.

Lebenslauf

Edith Koch, geb. Funk

- 26.4.1955 geboren in Schwabach
- 1961-1965 Grundschule in Kissing bei Augsburg
- 1965-1974 Humanistisches Gymnasium bei
St. Anna, Augsburg
- 1974 Reifeprüfung
- ab 1974 Studium der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität, München
- 1977 Diplom-Vorprüfung
- seit 1978 verheiratet mit Stefan Koch
- 1980 Diplom-Hauptprüfung
- Nov. 1980-
- Juli 1981 Diplomarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. Horst Schmieger
am Institut für Genetik und Mikrobiologie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München:
"Reinigung und Funktionsprüfungen von zwei
Phagen-codierten Proteinen, die an der
DNS-Verpackung des Phagen P22 beteiligt sind."
- Sept. 1981-
- Dez. 1984 Dissertationsarbeit bei
Prof. Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider in der
Abteilung für Virusforschung am
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
- Juni 1984 Auszeichnung durch das
Adolf-Butenandt-Stipendium

